

ENZYMHISTOCHEMISCHE UND
AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUM EINFLUSS EINER
PARTIELLEN HEPATEKTOMIE
AUF DIE LEBERTUMORINDUKTION
DURCH DIÄTHYLNITROSAMIN (DÄNA)
II. WIRKUNG EINES PROLIFERATIONSREIZES IM
SPÄTSTADIUM DER DÄNA-FÜTTERUNG

Wolf-Dieter Flakowski

1970

AN DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
BIBLIOTHEK

Verfasser: Professor Dr. H. R. H. R.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Verfasser: H. R. H. R.

Die folgenden Angaben sind zu entnehmen
an der Bibliothek der Universität Zürich

Die folgenden Angaben sind zu entnehmen
an der Bibliothek der Universität Zürich

H. R. H. R.

an der

1977

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

ENZYMHISTOCHEMISCHE UND AUTORADIOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS EINER PARTIELLEN
HEPATEKTOMIE AUF DIE LEBERTUMORINDUKTION
DURCH DIÄTHYLNITROSAMIN (DÄNA)
II. WIRKUNG EINES PROLIFERATIONSREIZES IM
SPÄTSTADIUM DER DÄNA - FÜTTERUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfasst und dem Fachbereich Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolf - Dieter Flakowski
aus München
1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.1978



Herrn Professor Dr. H.M. Rabes danke ich für die Themenstellung, Anleitung und Beratung bei dieser Arbeit.

Herrn Dr. H.V. Tuzek sowie Fräulein R. Kerler, Frau M. Kirkpatrick, Frau Dr. S. Czichos, Fräulein R. Casper, Herrn H. Hampe und Frau L. Döhle danke ich für ihre Unterstützung.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ra 101/19) durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

I. ALLGEMEINER TEIL	Seite
1. Zur Problematik der Entstehung der Enzymdefektbezirke (EDB, Inseln) durch Cancerogene	1
1.1. Zur Alkylierung von Basen in der DNS	2
1.2. Zur Theorie der Resistenz der neuen Zellpopulation gegen die Toxizität der Cancerogene	3
1.3. Zur Theorie der clonalen Genese der "Inseln"	3
2. Eigenschaften und Charakterisierung der "Inseln"	4
2.1. Veränderungen in der Enzymausstattung	4
2.2. Sonstige Veränderungen	5
2.3. Zur Koinzidenz von Veränderungen in den "Inseln"	6
3. Zu den Hyperplastischen Knoten	6
4. Zur Wachstumskinetik der "Inseln"	7
5. Zur Regeneration der 2/3 - hepatektomierten Leber	8
6. Allgemeine Fragestellung und Darstellung des Versuchs	9
II. SPEZIELLER TEIL	
1.1. MATERIAL UND METHODE	11
1.2. Mikroskopische Auswertung	14
1.3. Statistik	17
2. ERGEBNISSE	
2.1. Allgemeine Betrachtung	17
2.2. Ergebnisse der vergleichenden enzymhistochemischen und autoradiographischen Auswertung	
2.2.1. 60 Tage Däna - Fütterung	18
2.2.2. 90 Tage Däna - Fütterung	19
2.3. Überlebenszeiten der Kontrolltiere und deren Todesursache	
2.3.1. 60 Tage Däna - Fütterung	20
2.3.2. 90 Tage Däna - Fütterung	20

Tabellen	21
Abbildungen	31

3. DISKUSSION

3.1. Zur Problematik der mehrfachen Markierung mit ^3H - Thymidin	41
3.2. Zur Ermittlung des Markierungsindex in den EDB	42
3.3. Erörterung des Kurvenverlaufes des Markierungsindex in den EDB	
3.3.1. 60 Tage Däna - Fütterung	43
3.3.2. 90 Tage Däna - Fütterung	47
3.4. Zusammenfassende Betrachtung der Kurvenverläufe	48
3.5. Zu den Überlebenszeiten der Kontrolltiere	49
3.6. Abschlußüberlegungen	50

4. ZUSAMMENFASSUNG

51

LITERATURVERZEICHNIS

55

LEBENS LAUF

68

ABKÜRZUNGEN

ALS	Antilymphocyten Serum
ATPase	Adenosintriphosphatase
Däna	Diäthylnitrosamin
DMNA	Dimethylnitrosamin
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDB	Enzymdefektbezirk, "Insel"
G - 6 - Pase	Glucose - 6 - Phosphatase
GZ	Gezählte Zellen
HK	Hyperplastischer Knoten
MI	^3H - TdR - Markierungsindex
MZ	Markierte Zellen
n	Stichprobenumfang
S - Phase	DNS - Synthesephase
t_c	Zellcycluszeit
t_s	Dauer der DNS - Synthesephase
s	Standardabweichung der Stichprobe
TdR - ^3H - MI	^3H - Thymidin - Markierungsindex
$\bar{x}$	Mittelwert der Stichprobe

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Zur Problematik der Entstehung der Enzymdefektbezirke (EDB, Inseln) durch Cancerogene

Bei Dauerapplikation des Cancerogens Diäthylnitrosamin (Däna) (Druckrey et al. 1961) lassen sich bei einer Dosierung von 5 mg Däna/kg Körpergewicht/Tag bei der Ratte hepatocelluläre (Thomas 1961) Carcinome erzeugen (Schmähl, Preußmann und Hamperl 1960), an denen die Tiere nach $138 \pm 10,7$ Tagen sterben (Rabes et al. 1972). Während der ersten Tage der Applikation stehen toxische Effekte im Vordergrund, die reversibel sind (Rabes et al. 1972).

Seit langem ist bekannt, daß in vielen Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe Enzymdefekte bestehen (Greenstein 1955). Lange vor Auftreten der Carcinome, bei der erwähnten Dosierung nach etwa 40 Tagen, werden Bezirke mit histochemisch veränderten Hepatocyten in Präparaten mit entsprechender Enzymreaktion (Wachstein und Meisel 1954) sichtbar (Gössner und Friedrich-Frekxa 1964, Schauer und Kunze 1968). Diese Enzymdefektbezirke werden auch "Inseln" genannt (Friedrich-Frekxa et al. 1969) und sind nach dem Erreichen einer gewissen Größe nicht mehr reversibel (Schauer 1966, Rabes et al. 1970). Sie zeichnen sich durch einen Mangel an Glucose - 6 - Phosphatase (Weber und Cantero 1955) und Adenosintriphosphatase (Wachstein 1959) aus. Der Mangel an Glucose - 6 - Phosphatase führt zu einer Anhäufung von Glycogen in den betroffenen Zellen (Sydow und Fey 1969, Bannasch 1967, 1968, Schauer 1966).

1.1. Zur Alkylierung von Basen in der DNS.

Die Ursache für das Auftreten dieser neuen Zellpopulation könnte auf genetischer Ebene in einer Alkylierung von DNS - Basen durch das Nitrosamin liegen (Craddock 1974). Das für die Cancerogenese bedeutungsvollste Alkylierungsprodukt dürfte dabei das O^6 - Methylguanin sein, wie aus Versuchen mit Dimethylnitrosamin hervorgeht (Loveless 1969, Gerchmann und Ludlum 1973). Im Falle des Däna wird analog O^6 - Äthylguanin gebildet (Craddock 1975). Dabei scheint der Zeitpunkt der Alkylierung wichtig zu sein, da die alkylierte DNS von sogenannten "Repair - Enzymen" repariert wird (Craddock 1974). Nur wenn die DNS - Replikation stattgefunden hat, ehe die alkylierten Basen entfernt worden sind, kann die Veränderung "vererbt" werden. Die Empfindlichkeit eines Organs für eine cancerogene Wirkung wird dabei anscheinend von der Fähigkeit bestimmt, Veränderungen der DNS zu reparieren (Nicoll, Swann und Pegg 1974). Da der toxische Effekt der Nitrosoverbindungen zu einer regenerativen Hyperplasie führt, treffen diese Cancerogene auf zahlreiche replizierende Zellen (Craddock 1975).

Die Entstehung der alterierten Hepatozyten, die als Tumovorläufer gelten (Epstein et al. 1967), scheint also durch Mutation, im Sinne eines sog. "one hit process" ausgelöst zu werden, was Scherer et al. (1972) auch aus der proportionalen Abhängigkeit der Zahl der Inseln von der Däna - Dosis ableiteten.

1.2. Zur Theorie der Resistenz der neuen Zellpopulation gegen die Toxizität der Cancerogene

Die neu entstandenen Zellen scheinen, wie schon Haddow (1938) vermutete, gegen die Toxizität der Cancerogene resistent zu sein. Viele Cancerogene wie 2 - Fluorenylacetamid (Laird und Barton 1959, 1961, Laws 1959, Dawson 1972) oder Diäthylnitrosamin (Coté, Oehlert und Büchner 1962, Rabes et al. 1970) sind starke Mitose- und/oder DNS - Synthese - Hemmer. Die neue enzymdefiziente Zellpopulation scheint gegen diese Hemmung resistent zu sein und kann trotz der toxischen Eigenschaften der Cancerogenmetaboliten proliferieren (Skoryna und Webster 1951, Laird und Barton 1959, Kitagawa 1971). Farber et al. (1976) vermuten, daß diese Resistenz durch Verminderung der Carcinogenaktivierung zustande kommt.

1.3. Zur Theorie der clonalen Entstehung der Inseln.

Da die durch Wirkung des Cancerogens alterierten Hepatozyten sich durch einen Mangel an Glucose - 6 - Phosphatase und ATPase auszeichnen, sind sie auf diese Weise sichtbar zu machen (Wachstein und Meisel 1954). Da sich die Zellen jedoch offenbar mehrmals geteilt haben müssen, ehe ihre Enzymdefizienz nachweisbar wird, ist es nicht möglich, einzelne alterierte Hepatozyten zu identifizieren (Friedrich-Frekxa et al. 1969 b). Es stellt sich somit die Frage, ob die Inseln aus einer Zelle durch Proliferation, also clonal, oder appositionell bzw. additiv entstehen. Da die Inseln bzw. Tumoren in ihrer Enzymausstattung sehr homogen, untereinander jedoch sehr heterogen sind, halten die gleichen Autoren eine clonale Genese für wahrscheinlich. Scherer und Hoffmann (1971) konnten die Theorie der clonalen Ent-

stehung weiter erhärten. Mittels autoradiographischer Methoden zeigten sie, daß nach Vormarkierung der Leber Inselzellen, fünf Wochen nach Induktion, im Gegensatz zum umliegenden, stark markierten Parenchym, kaum markiert waren. Es muß also, so folgern sie, die Insel durch Teilung aus einer Zelle entstanden sein, wodurch sich die Markierung verdünnt. Auch das exponentielle Wachstum der Insel spricht für die clonale Entstehung (Scherer und Hoffmann 1971, Robes und Scholze 1972). Auch Farber (1970), Maini und Stich (1962), Webber und Stich (1960) halten die Entstehung der Inseln aus einer Einzelzelle für wahrscheinlich. Es gibt jedoch eine Reihe von Beobachtungen, die gegen diese Annahme sprechen (siehe Friedrich-Frekxa et al. 1969, Rappaport 1963).

2. Eigenschaften und Charakterisierung der Inseln.

Die Enzymdefektbezirke treten konzentrationsabhängig nach einer Gesamtdosis von 200 - 255 mg Däna/kg auf. Zwischen dem Erscheinen der Inseln und dem ersten Auftreten von Tumoren scheint ein von der Däna-Dosis unabhängiges Intervall von 77 - 91 Tagen zu liegen (Friedrich-Frekxa et al. 1969 b). Daß diese Inseln die Vorläufer der späteren hepatozellulären Carcinome beherbergen und sie als Präcancerosen aufzufassen sind, wird von mehreren Autoren angenommen (Epstein et al. 1967, Reuber 1965, Farber 1973, Kitagawa und Sugano 1973). Scherer und Emmelot (1975) fanden topologische Beziehungen zwischen kleinen Tumoren und verbliebenem Inselgewebe.

2.1. Veränderungen in der Enzymausstattung.

Neben dem genannten Mangel an ATPase und Glucose - 6 - Phosphatase zeichnen sich die Inselzellen noch durch eine Reihe anderer

Veränderungen im Enzymhaushalt aus, wie bei der Tryptophanoxygenase, Thyrosin - und Ornithin - Aminotransferase, Serinhydratase, Glucokinase, Glucose - 6 - Phosphat - Dehydrogenase (Anderson et al. 1966, Fiala und Fiala 1959, Poirier, Poirier und Pitot 1968) und andere (Friedrich - Freksa et al. 1969 b). Dabei wurde nicht nur der Verlust von Enzymen, sondern auch deren Wiedererscheinen beobachtet, wie das der Enzyme Serin - Dehydrogenase und β - Glucuronidase (Kitagawa und Pitot 1975). Nach Friedrich - Freksa et al. (1969 b) sind die enzymatischen Veränderungen umso geringer, je kleiner die Cancerogen - Dosis ist. Da diese Veränderungen nicht in allen Lebercarcinomen gefunden werden, vermutet man, daß sie nur zufällige Begleiterscheinungen der Cancerogenese sind (Morris und Pitot (vergl. Pitot 1969)).

2.2. Sonstige Veränderungen

Außer den Veränderungen in der Enzymausstattung unterscheiden sich die Inselhepatozyten auch noch durch eine Reihe anderer Faktoren vom umliegenden Parenchym, wie z.B. dem Verlust des gewebs - spezifischen Antigens der Mikrosomen (Friedrich-Freksa et al. 1969 b), oder durch das Auftreten eines fetalen Proteins, dem Alpha - Feto - protein (Okita et al. 1974). Auch das Verschwinden eines präneo - plastischen Antigens konnte beobachtet werden (Farber 1974). Weiterhin gibt es Unterschiede im immunologischen Verhalten der alterierten Hepatozyten (Friedrich-Freksa und Hoffmann 1969, Scherer, van Djik und Emmelot 1975).

2.3. Zur Koinzidenz von Veränderungen in den Inseln

Die beschriebenen Veränderungen, z.B. der Verlust der Glucose - 6 - Phosphatase, der ATPase und des gewebsspezifischen Antigens der Mikrosomen kombinieren sich in der verschiedensten Weise in den einzelnen Inseln und Tumoren (Friedrich-Frekso et al. 1969 b). Kitagawa und Pitot (1975) fanden eine gute Korrelation zwischen den Aktivitäten der Glucose - 6 - Phosphatase und der β - Glucuronidase bzw. der Serin - Dehydratase. Die Gesamtkoinzidenz der Defekte verschiedener Enzyme nimmt mit der Größe der Inseln zu. Die Ausfälle der beiden Enzyme ATPase und G - 6 - Pase waren ab einem Inseldurchmesser von 500 μ annähernd 100 %. Bei der Koinzidenz mehrerer Enzymausfälle ließ sich ein schnelleres Wachstum der EDB beobachten (Schieferstein et al. 1974). Dies gilt offenbar jedoch nicht für die später erscheinenden Carcinome (Farber 1963, 1970, Teebor und Becker 1971). Nicht zuletzt seien noch die morphologischen (Grundmann und Sieburg 1962) und Zellzyklusveränderungen (Newberne 1976) erwähnt.

3. Zu den "Hyperplastischen Knoten"

Die ersten makroskopisch sichtbaren Veränderungen während der Hepatocancerogenese mit den verschiedenen Carcinogenen sind die sog. hyperplastischen Knoten (Farber 1956, Bannasch 1968, Magee und Barnes 1956, Schauer und Kunze 1968). Der hyperplastische Knoten ist größer als die frühen EDB und komprimiert das umliegende Parenchym (Farber 1973, Reuber 1963, 1965).

Die Knoten können sich in zwei Richtungen entwickeln:

1. Durch Reifung und Differenzierung können sie einen gutartigen Zustand behalten. Dies wurde histochemisch (Kitagawa 1971,

Kitagawa und Sugano 1975), histologisch (Farber 1975, Farber et al. 1975) und durch das Chromosomenmuster (Becker et al. 1971) belegt.

2. Sie können durch Entdifferenzierung unreifer werden und maligne entarten (Kitagawa und Pitot 1975).

4. Zur Wachstumskinetik der Inseln.

Die Zahl der Inseln steigt bei Dauerfütterung mit Däna bis zum 70. Tag etwa exponentiell an (Rabes et al. 1972). Auch nach einmaliger Applikation des Cancerogens nach Teilhepatektomie steigt die EDB-Zahl bis zur 6. Woche steil an, um dann constant zu bleiben (Scherer et al. 1972). Dabei wurde eine lineare Zunahme der volumetrischen Fraktion der EDB gemessen. Bis zum 80. Tag sind mehr kleine EDB vorhanden, danach steigt die Zahl der großen EDB an (Rabes et al. 1972). Nach Schieferstein et al. (1974) ist das exponentielle Wachstum der Anzahl und Flächen der EDB abhängig von der verabreichten Däna-Dosis. Je höher die Dosis, desto schneller ist das Wachstum der EDB (Scherer und Emmelot 1973). Bis zum 90. Tag ist der Markierungsindex in den EDB nicht wesentlich höher als im umliegenden Parenchym (Rabes et al. 1970 b). Andere Autoren beschreiben ein langsames Wachstum über einen Zeitraum von 70 - 105 Tagen, das dann in eine schnellere Proliferation umschlägt (Friedrich-Frekxa et al. 1969 b, Rabes und Zettler 1974). Ab dem 90. Fütterungstag steigt der ^3H - Thymidin - Markierungsindex (MI) in manchen EDB an, in anderen nicht, ein Zeichen für die Heterogenität der EDB bezüglich ihres Wachstumsverhaltens (Rabes et al. 1972). Gleichzeitig mit der gesteigerten Mitoserate verlieren die Zellen die Fähigkeit, auf einen Proliferationsreiz zu antworten. Rabes et al. (1970) fanden in den EDB nach partieller Hepatektomie zu späten

Zeitpunkten nach Beginn der Däna-Fütterung keinen höheren ^3H - Thymidin - Markierungsindex als ohne Teilhepatektomie. Nach 90 Tagen treten innerhalb der Inseln Subpopulationen verstärkter Proliferation auf, die einen Teil der Enzymdefektbezirke ersetzen und die als mögliche Vorläufer der späteren hepatozellulären Carcinome angesehen werden (Rabes et al. 1972). Bei Dauerfütterung fanden die gleichen Autoren eine bis zum 90. Tag zunehmende Parenchymmarkierung, die dann bis zu 130. Tag wieder auf Werte von 6 - 7 % absinkt. Das Wachstum der EDB kann auf mannigfache Weise beeinflusst werden. Die Anwendung von Kaninchen - Antilymphozytenserum kann z.B. die Entstehung von Tumoren beschleunigen (Burnstein und Allison 1969, Laws 1970). Die Anzahl und Größe von Inseln kann durch Kombination von Däna mit Antilymphozytenserum im frühen Stadium der Cancerogenese gesteigert werden (Friedrich-Frekxa und Hoffmann 1969). Scherer et al. (1975) konnten dagegen keine erhöhte Tumorausbeute durch ALS-Gabe während der Frühzeit der Cancerogenese erzeugen. Sie vermuten u. a., daß Tumorzellvorläufer, die von den Zellen der Enzymdefektbezirke verschieden sind, durch Immunsuppression der EDB-Zellen in ihrem Wachstum begünstigt werden.

5. Zur Regeneration der 2/3 - hepatektomierten Leber.

Nach einer 2/3 - Hepatektomie wird der Parenchymverlust durch excessive Proliferation des verbliebenen Lebergewebes ersetzt (Grisham 1962, Rabes und Brändle 1969). Das Maximum der Mitosewelle erreicht das Ausmaß malignen Wachstums, und der größte Teil des Zelldefizits wird dabei in den ersten drei Tagen ersetzt (Fabrikant 1968). Nach 2 - 3 Wochen kehrt die Anzahl der DNS-synthetisierenden Zellen langsam wieder zu ihrem Ausgangswert zurück (Grisham 1962,

Fabrikant 1968, Rabes und Tuzcek 1970). Die Behandlung von 2/3-hepatektomierten Ratten mit Döna führt zur Hemmung der Regeneration (Mohr und Speetzen 1967). Rabes et al. (1969) verabreichten 20 Tage lang 5 mg Döna/kg/Tag und fanden eine deutliche Verminderung der proliferierenden Leberzellen nach 2/3 - Hepatektomie.

6. Allgemeine Fragestellung und Darstellung des Versuchs.

Schon 1945 wies Mottram auf die enge Beziehung von Tumorentstehung und Zellteilung bei der Induktion von Hautpapillomen hin. 1964 bewiesen Frei und Ritchie bei der 7,12 - Dimethylbenzanthren - Cancerogenese die Bedeutung des proliferativen Zustandes der Zellen für die Erzeugung von Hautkrebs. In zahlreichen Versuchen konnte eine Erhöhung der Zahl der Enzymdefektbezirke (Scherer et al. 1972) und der Tumorausbeute durch Hepatocarcinogene erzielt werden, wenn die Substanzen nach einer Teilhepatektomie gegeben werden (Scherer und Emmelot 1975, Craddock 1971, 1974, Schieferstein et al. 1974). In diesen Versuchen stand die Cancerogengabe in unmittelbarem Zusammenhang mit der Teilhepatektomie. Es gibt auch einige Untersuchungen, in wie weit sich eine Wachstumsstimulation auf eine präneoplastische veränderte Zellpopulation, bezüglich des Auftretens von Tumoren und Abkürzung der Überlebenszeiten der Versuchstiere auswirkt. Die Ergebnisse sind jedoch uneinheitlich (Glinos, Bucher und Aub 1951, Laws 1959, Rajewsky et al. 1966, Hollander und Bentvelzen 1968). Das Regenerationswachstum der Leber unterstützt die Wirkung eines Cancerogens, wenn eine Hyperplasie der Leber innerhalb der ersten 3 Wochen der Carcinogengabe induziert wird (Hoffmann 1970). Rabes, Scholze und Hartenstein (1970) konnten dagegen zeigen, daß wiederholte Leberresektionen vor dem Auftreten

von Glucose - 6 - Phosphatasefreien EDB, also bis etwa zum 40. Tag, nur einen geringen Einfluß auf die Überlebenszeit oder die Tumorausbeute bei den betroffenen Tieren hat. Allerdings ist die Reaktion der Inselzellen auf eine 2/3 - Hepatektomie am Anfang der Däna - Cancerogenese sehr stark. Eine verstärkte regenerative Proliferation war bei Dauerfütterung bis zum 90. Tag nachweisbar. Die Reaktion nimmt später jedoch ab und am 130. Tag nach Fütterungsbeginn reagieren die EDB-Hepatozyten nicht mehr auf eine 2/3 - Hepatektomie (Rabes et al. 1970).

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, die Reaktion einer präneoplastisch veränderten Zellpopulation auf eine 2/3 - Hepatektomie zu beobachten. Zu diesem Zweck wurde einer Gruppe von Ratten 60 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag, einer anderen Gruppe 90 Tage lang die gleiche Dosis Däna verabreicht. Die anschließende Teilhepatektomie erfolgte zu einem Zeitpunkt, zu dem das Däna bereits metabolisiert war.

In Versuchen, in denen Ratten 60 bzw. 90 Tage lang die oben erwähnte Dänadosis verabreicht worden war, und in denen dann die Tiere nicht teilhepatektomiert wurden, lebten die Tiere noch 280, bzw. 160 Tage (Rabes und Zettler 1974), um dann an hepatozellulären Carcinomen zu sterben. Eine nach Ablauf der Däna fütterung vorgenommenen 2/3 - Hepatektomie könnte möglicherweise die vorgeschädigten Zellen beeinflussen und ihre Proliferationskinetik verändern. Das Wachstumsverhalten wurde anhand autoradiographischer Methoden, mittels des Markierungsindex registriert.

Nach Ablauf der Däna - Fütterung wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten mit radioaktiv markiertem Thymidin injiziert und an-

schließlich getötet. Die aus den Lebern dieser Tiere gewonnenen Kryostatserienschnitte wurden nach Herstellung von enzymhistochemischen Präparaten und Autoradiographien im Vergleichsmikroskop untersucht. Aus dem Vergleich der Proliferationsraten in den neoplastisch veränderten Bezirken, die sich als Enzymausfallbezirke darstellen, zu verschiedenen Zeitpunkten der Däna - Cancerogenese nach 2/3 - Hepatektomie, erhält man Aufschlüsse über das Wachstumsverhalten in diesen Bezirken.

Einer Gruppe von Tieren wurde 60, einer anderen 90 Tage lang Däna verabreicht. Diese Tiere werden anschließend ebenfalls hepatektomiert, um die Überlebenszeit zu ermitteln und die dann mit bekannten Daten über Absterberaten zu vergleichen. Auf diese Weise kann man dann den Einfluß eines Wachstumsreizes auf präneoplastische Enzymdefektbezirke ermitteln und die Entwicklung eventueller Carzinome aus diesen Veränderungen verfolgen.

II. Spezieller Teil

1.1. Material und Methode

110 männliche Ratten vom Stamm Wistar AF/Han mit einem Anfangsgewicht von 98 - 106 g erhielten Altromin - Standard - Diät. Im Trinkwasser wurde 5 mg Diäthylnitrosaminlösung (Däna)/kg Körpergewicht/Tag verabreicht. Die der Gewichtszunahme der Tiere entsprechende Mengenzunahme wurde wöchentlich ermittelt. Die Tiere waren jeweils zu zweit in einem Käfig untergebracht. 60 Tiere erhielten 60 Tage lang die oben angegebene Menge an Däna, 50 Tiere 90 Tage lang die gleiche Dosis. In der 60 - Tage - Gruppe starben 7, in der 90 - Tage -

Gruppe ebenfalls 7 Tiere vor oder während der 2/3 - Hepatektomie.

Alle Tiere wurden schließlich nach Ablauf der jeweiligen Zeit nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) zwischen 8⁰⁰ und 12⁰⁰ Uhr 2/3 - hepatektomiert. Hierbei wurden nach Abbinden am Hilus der Lobus medialis und der Lobus sinistrolateralis entfernt. Der Lobus dextrolateralis, der Lobus caudatus und der Processus papillaris wurden belassen. Anschließend wurden die Tiere jeweils zu fünf in einem Käfig untergebracht, und es wurde nur noch Altromin - Standard - Diät sowie Däna - freies Trinkwasser gegeben. Von den Ratten, die 60 Tage lang Däna erhalten hatten, wurden jeweils 5 Tiere am 10., 40., 70., 100. und 160. Tag nach Teilhepatektomie getötet und die Tiere, die 90 Tage Däna erhalten hatten, am 10., 40., 60. und 70. Tag nach der Operation getötet. (Tab. 1 und 2).

Vor Ablauf des Intervals bis zur Tötung wurde den jeweiligen 5 Tieren in Intervallen von 6 Stunden siebenmal eine i.p. Injektion von ³H - Thymidin gegeben (6 - ³H - Thymidin, ³H-TdR, 0,8 µ Ci/g KG, spezifische Aktivität 5,0 Ci/mmol, Hersteller: Radiochemical Centre Amersham). Eine Stunde nach der letzten Injektion wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet. (Siehe auch Tabelle 1 und 2). Mit dieser Methode ist es möglich, sämtliche Hepatozyten zu markieren, die sich während der 37 Stunden, das entspricht etwa der Zellcyclus - dauer, in der 7 Stunden währenden DNS - Synthese befinden. Hierbei werden auch die S - Phasen erfaßt, die bei der ersten Injektion gerade beginnen. Auf diese Weise war es möglich, Aufschluß über die Größe der Wachstumsfraktion zu erhalten, (Mendelsohn 1962, 1962 b), die sich zum entsprechenden Zeitpunkt der Däna - Cancerogenese in Proliferation befand. Den getöteten Tieren wurde der Lobus dextrolateralis entnommen und sofort mittels flüssigem CO₂ tiefgefroren. Der Rest der regenerierten Leber

wurde in Formol fixiert, dem inaktives Thymidin (0,1 mg/ml) zum Austausch mit dem nicht in Nucleinsäuren eingebauten, markierten Material beigegeben war, und für Paraffinschnitte vorbereitet. Von den tiefgefrorenen Leberstückchen wurden mit dem Kryostat (Cryostat-Duspiva, Heidelberg) von jeder Leber 21 Schnitte von 5 µm Dicke als Serienschnitte hergestellt. Pro Untergruppe ergaben sich somit 105 Schnitte. Jeder 3. Schnitt wurde alterierend für den histochemischen Nachweis des ATPase - Mangels, die Autoradiographie, und zum Nachweis des Glucose - 6 - Phosphatase - Mangels verwendet. Die beiden Enzyme wurden mit der modifizierten Methode von Wachstein und Meisel (1954) nachgewiesen:

Die Kryostatschnitte wurden 5 Minuten getrocknet, dann in eine Lösung, bestehend aus:

10,0 ml Trismaleatpuffer (0,2 m pH 7,2)

0,2 ml Magnesiumsulfat (1,2% = 0,1 m)

1,5 ml Bleinitrat (2%)

1,5 ml Aqua dest. getaucht,

der im Falle des ATPase - Mangelnachweises

10,0 mg Adenosin - 5 - triphosphat (kristallisiertes

Dinatriumsalz $C_{10}H_{14}N_5O_{13}Na_2 \cdot 3 H_2O$, Boehringer, Mannheim),

gelöst in :

5,0 ml Aqua dest., zugesetzt wurde.

Im Falle des Glucose - 6 - Phosphatase - Defizits wurde der obigen

Lösung 5,0 mg Glucose - 6 - Phosphat (kristallisiertes

Dinatriumsalz $C_6H_{11}O_9P Na_2$, Boehringer Mannheim),

gelöst in:

5,0 ml Aqua dest. zugesetzt.

Die Präparate wurden für 30 Minuten bei 37° C inkubiert und an-

schließend, nach Spülung in lauwarmem Leitungswasser und Aqua dest., für genau 15 Sekunden in eine Ammoniumsulfidlösung getaucht. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. erfolgte eine 10 minütige Fixierung in 10% Formol, ein 10 minütiges Wässern, dann das Eindecken in Glyceringelatine.

Der Schnitt für das Autoradiogramm wurde 24 Stunden in neutralisiertem Formol, dem 0,5 mg/ml inaktives Thymidin beigegeben war, fixiert. Vor Abbringen des Kodak Stippingfilmes AR 10 wurden die Präparate mit Chromalaungelatinelösung überzogen, etwa 3 Wochen lang inkubiert und dann mit Amidol - Entwickler entwickelt und fixiert. Anschließend wurden sie mit Hämatoxilin/Eosin gefärbt

1.2. Mikroskopische Auswertung.

Da sich die ATPase defizienten Inseln besser darstellten als die Glucose - 6 - Phosphatase-Defektbezirke, wurden für die Auswertung die ATPase-Präparate ausgewählt.

Mittels eines Maskenvergleichsmikroskops von Leitz/Wetzlar konnten die Serienschritte zur Deckung gebracht werden. Dieses Maskenvergleichsmikroskop ist eine Variante des Universal-Werkstatt-Mikroskops UW 11. Es wird zur optischen Kontrolle in der Maskenfertigung verwendet. Das Gerät besitzt zwei Objektivrevolver und zwei Objektivtische. Der Abstand der optischen Achsen beträgt 130 mm, so daß maximal eine Fläche von 75 x 75 mm durchgemustert werden kann. Der linke Tisch ist sowohl in Richtung der Y - Achse und der X - Achse verschiebbar, als auch in der Z - Achse drehbar, wobei der Drehpunkt exzentrisch liegt. Der

rechte Tisch ist um die Z - Achse drehbar und um die gleiche Achse vertikal verschiebbar, um diesen Tisch dem linken Tisch schrägförmig anzupassen. Beide Tische sind synchron in X - und Y - Richtung beweglich. Die Objekte lassen sich durch ein Binokular betrachten.

Der Arbeitsgang ist folgendermaßen:

Zunächst wird das Objekt auf dem linken Tisch fokussiert. Dies geschieht mittels einer Grob - und Feinfokussierungseinrichtung. Dann wird das Objekt auf dem rechten Tisch um die Z - Achse gegen den linken Tisch verschoben. Darauf bringt man beide Objekte mittels Verschiebung in X - Achsen, Y - Achsen bzw. Drehung in Z - Achsen - Richtung zur Deckung, wobei man sich an Strukturen wie Zentralvenen, Glisson'schen Dreiecken und sonstigen charakteristischen Gebilden orientiert, die in den Serienschnitten die größtmögliche Ähnlichkeit besitzen. Durch wechselweises Beleuchten des einen oder anderen Präparates und gleichzeitiges schwaches Beleuchten des anderen (was ein Durchscheinen des Präparates bewirkt), kann man entsprechende Strukturen zur Deckung bringen (Abb. 9).

Problematisch war, wenn sich die Präparate beim Schneiden im Kryostat verzogen hatten. Man konnte dann nicht das Präparat insgesamt zur Deckung bringen, sondern nur Teile davon. Hierbei mangelte es manchmal an vergleichbaren Strukturen.

In das Okular war ein Raster eingesetzt, das in 10 x 10 Felder unterteilt war. Um die Präparate durchzumustern, wurden die beiden Objekt - Tische synchron meanderförmig bewegt. An den beiden

Objekten wurde durch wechselweises Beleuchten jeweils nach - kontrolliert, ob entsprechende Strukturen deckungsgleich waren. Nun konnte man die EDB mit den Autoradiographien vergleichen. Pro Präparat wurden 10 Ausfallsbezirke begutachtet, die in drei Größenklassen unterteilt wurden. Die Auswertung wurde bei einer Objektvergrößerung von 16 durchgeführt, was für die Rastereinheit eine absolute Größe von 85 μ Länge ergibt. Auf diese Weise konnte die Fläche der EDB berechnet werden:

1. EDB $< 0,15 \text{ mm}^2$ = kleine Insel
2. EDB $0,15 \text{ mm}^2 - 0,40 \text{ mm}^2$ = mittlere Insel
3. EDB $> 0,40 \text{ mm}^2$ = große Insel

Dabei wurden durch meanderförmiges Durchmustern dieser EDB bis zu 20 000 Hepatozyten ausgezählt. Mesenchymzellen u.a. wurden nicht berücksichtigt. Als markiert galt ein Hepatozyt, wenn die Silberkorndichte über seinem Zellkern deutlich größer war als die des Umfeldes. Die kleinsten ausgewerteten Inseln waren $0,025 \text{ mm}^2$ groß und enthielten etwa 30 Zellen, die größten abgrenzbaren EDB waren $4,0 \text{ mm}^2$ groß. Bei diesen Inseln wurden bis zu 1 000 Zellen ausgezählt. Bei der Ermittlung der Markierungsindices der EDB, mit dem Maskenvergleichsmikroskop, konnten mit großer Genauigkeit entsprechende Bezirke zur Deckung gebracht werden. Bei der gewählten Vergrößerung konnten selbst Objekte wie einzelne Zellen zur Deckung gebracht werden. Schwierigkeiten bereitete es, wenn, wie beschrieben, Präparate durch das Schneiden verzogen waren. Manchmal konnten dann nur Teile der Präparate zur Deckung gebracht werden. Deshalb waren größere EDB oft nur mit Mühe auszuwerten. Unter Aussparung der Ausfallsbezirke wurden auch die markierten Parenchymzellen (Hepatozyten) ausgezählt.

Die Gruppe von Ratten, die teilhepatektomiert, aber nicht zu den autoradiographischen Versuchen herangezogen wurde, stellte die Kontrollgruppe zur Bestimmung der Überlebenszeit dar.

1.3. Statistik.

Die Berechnung des Mittelwertes $\bar{x}$ einer Stichprobe

$x_1 \dots x_n$ erfolgte nach der Gleichung: $\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$

Die Standardabweichung s wurde nach folgender Gleichung

berechnet: $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2}$

Stichprobenumfang = n .

2. ERGEBNISSE

2.1. Allgemeine Betrachtung.

Sämtliche untersuchten Präparate enthielten EDB, "Inseln", die sich bei den oben beschriebenen Enzymreaktionen als helle Areale vom umliegenden Parenchym abhoben. Auf eine Bestimmung des quantitativen Flächenanteils der EDB am Gesamtparenchym und der Anzahl der Inseln wurde verzichtet. In sämtlichen EDB wurden markierte Hepatozyten gefunden. Der ^3H - TdR - Markierungsindex (MI) wurde prozentual aus der Anzahl der markierten Zellkerne zur Anzahl der Zellkerne / EDB berechnet.

Eine Schwierigkeit bei der Ermittlung des MI war, daß die EDB

in vielen Fällen nicht gleichmäßig markiert waren. Meist gab es Areale, sei es am Rande der Insel, sei es in der Nähe eines mit der Insel in Kontakt stehenden Gefäßes oder als Nest innerhalb des EDB, die stärker markiert waren als der übrige EDB (Abb. 11). Innerhalb der Präparate gab es EDB hoher, in wenigen Fällen bis zu 90%, wie niedriger Markierung. Dabei spielte die Größe des EDB keine Rolle. Auch die Mittelwerte der Markierungsindices innerhalb einer Tiergruppe, z.B. 60 Tage Däna, 100 Tage Lauf - zeit nach Teilhepatektomie, die aus 4 Tieren bestand, unterscheiden sich zum Teil um das 2-4 fache. Diese Streubreite findet ihren Niederschlag in den zum Teil großen Standardabweichungen (Tab. 3, 4 Abb. 1, 2).

2.2. Ergebnisse der vergleichenden enzymhistochemischen und autoradiographischen Auswertung.

2.2.1. 60 Tage Däna - Fütterung

Der erste radioaktive Versuch wurde in dieser Gruppe 10 Tage nach Teilhepatektomie durchgeführt. Es fand sich in den EDB ein gegenüber dem umliegenden Parenchym deutlich erhöhter MI.

Die Markierungsindices lagen zwischen 0% und 39,8% (Tabelle 3, Abb. 1 und Abb. 3). Auch die Markierung des umliegenden Parenchyms ist mit 1,7% deutlich gegenüber dem der intakten Leber erhöht. (Tab. 5, Abb. 1). Es kamen insgesamt 5 205 Zellen zur Auszählung, der mittlere MI in den EDB war zu diesem Zeitpunkt 14,0%

Die weiteren radioaktiven Versuche wurden am 40., 70., 100. und 160. Tag durchgeführt. Es kamen jeweils 9 157, 13 396, 19 710, und 19 903 Zellen zur Auszählung, die mittleren MI waren dabei 11,8%, 2,9%, 7,5%, 7,5% in den EDB und 1,4%, 0,6%, 1,6%, und 2,4% im umliegenden Parenchym (Tab. 3 und 5, Abb. 1 und 3).

Aus der Tabelle und den dazugehörigen Graphiken läßt sich er - sehen, daß eine relativ große Streubreite der Einzelwerte besteht, besonders zum 1. Termin am 10. Tag nach Teilhepatektomie

2.2.2. 90 Tage Däna - Fütterung

Auch in dieser Gruppe gab es keine Präparate ohne EDB. Der erste radioaktive Versuch wurde am 10. Tag, die weiteren am 40., 60., und 70. Tag durchgeführt. Die Werte für die EDB-Markierungsindices waren zu den entsprechenden Zeitpunkten 20,1%, 3,95%, 6,4% und 4,1%, die des umliegenden Parenchyms 5,3%, 0,47%, 0,98% und 1,47%.

(Tabelle 4 und 6, Abb. 2 und 4). Zur Auszählung kamen dabei 3 626, 8 889, 19 657 und 22 526 Zellen für die Bezirke mit Enzymdefekt und etwa ebenso viele für das umliegende Parenchym.

Bei den Tieren mit langer Laufzeit nach Teilhepatektomie war es zum Teil schwierig, Inseln mittlerer und größerer Fläche zu finden, da diese oft konfluiert waren und die Abgrenzung nicht mehr möglich war.

In den EDB fanden sich zu späteren Zeitpunkten nach 2/3-Hepatektomie Größenunterschiede zwischen den Zellen. Die Kern - Plasmarelation war oft unterschiedlich und das Zellbild im ganzen unruhig.

2.3. Überlebenszeiten der Kontrolltiere und deren Todesursache.

2.3.1. 60 Tage Däna-Fütterung

Die Tiere in dieser Gruppe lebten nach der 2/3 Hepatektomie noch durchschnittlich $229 \pm 74,2$ Tage. Da jedoch bei einigen Tieren keine Todesursache mehr feststellbar war, weil es unter den Tieren zu Kannibalismus gekommen war, wurden nur die Tiere in die Tabelle aufgenommen, deren Todesursache gesichert ist. Auch der mittlere Todeszeitpunkt ändert sich damit auf $233,4 \pm 81,8$ Tage (Tab. 9, Abb. 5 und 7). Es besteht also eine große Streuung. Fast alle Tiere hatten zum Zeitpunkt des Absterbens Lebertumoren, einige auch Nierentumoren. Metastasen wurden in der Lunge, dem Ösophagus und dem großen Netz gefunden. Einige Tiere waren an Pneumonie gestorben, hatten aber ebenfalls canceröse Veränderungen an Leber oder Nieren, bzw. Metastasen in der Lunge. In Tabelle 7 sind die Überlebenszeiten mit Todesursache zusammengestellt.

2.3.2. 90 Tage Däna-Fütterung

Nach 90 Tagen Däna und anschließender 2/3 Hepatektomie lebten die Tiere noch durchschnittlich $81,6 \pm 35,5$ Tage. Auch hier konnte bei einigen Tieren die Todesursache nicht mehr festgestellt werden. Auch diese Tiere wurden nicht in die Statistik aufgenommen. Damit ändert sich der mittlere Todeszeitpunkt auf $81,9 \pm 34,1$ Tage. (Tab. 9, Abb. 5 und 7). Hier besteht ebenfalls eine große Streuung. Sämtliche Tiere hatten Lebertumoren. Metastasen wurden in der Lunge, dem Ösophagus und dem großen Netz gefunden. Einige Tiere waren an Pneumonie gestorben. Sie hatten genau wie in der Gruppe der 60 Tage mit Däna gefütterten Tiere canceröse Veränderungen an Leber und Niere, In Tabelle 8 sind die Überlebenszeiten mit Todesursachen zusammengestellt.

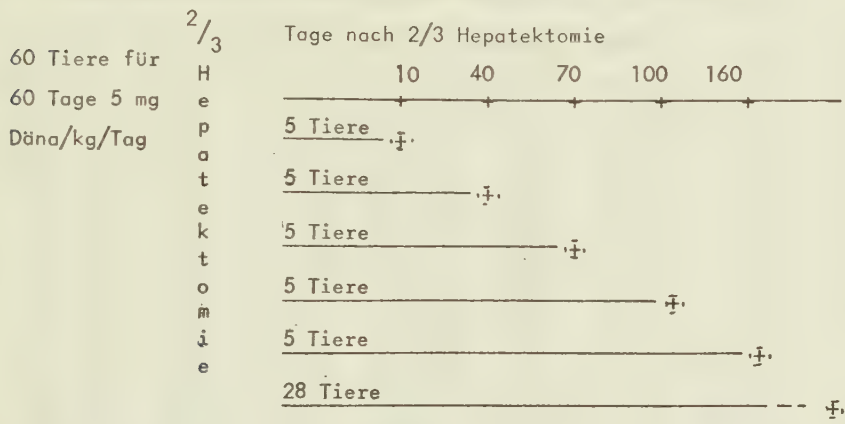


Tabelle 1 (Legende siehe unten)

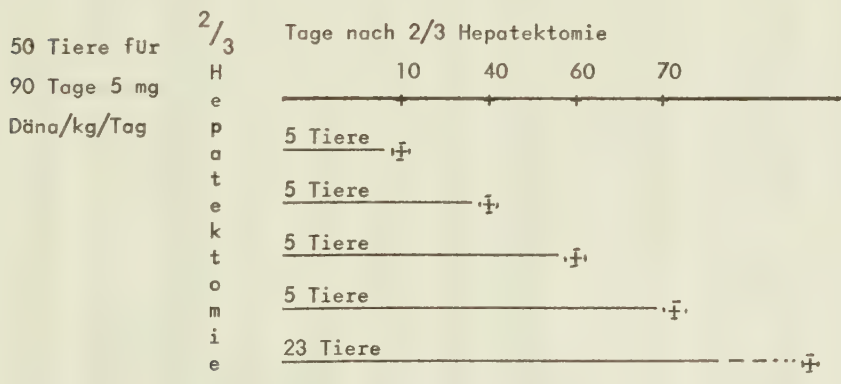


Tabelle 2:

Tab. 1, 2: 60 Tiere wurden nach 60, 50 Tiere nach 90 Tagen 5 mg Däna/kg/Tag $\frac{2}{3}$ -hepatektomiert. Jeweils 5 Tiere wurden nach der angegebenen Anzahl von Tagen durch Nackenschlag getötet. 37 Stunden vor Tötung wurde in 6 stündigem Intervall 7 mal ^3H -TdR i.p. injiziert (siehe Text). Die restlichen Tiere wurden als Kontrollgruppe gehalten, und ihre Überlebenszeit und Todesursache wurden registriert. In beiden Gruppen starben je 7 Tiere vor oder während der Teilhep.

Tab.3

10 Tage nach Teilhep.

40 Tage nach Teilhep.

70 Tage nach Teilhep.

Fläche GZ MZ MI (%)
(mm²)

0,05	63	14	22,2
0,02	34	8	23,5
0,07	77	12	15,5
0,02	38	3	7,9
0,12	118	32	27,1
0,05	52	2	3,8
0,01	3	-	0,-
0,06	52	7	13,4
0,04	45	5	11,0
0,13	114	4	3,5
0,10	115	28	24,3
0,04	50	6	12,0
0,02	23	7	30,4
0,07	92	16	17,4
0,06	47	5	10,6
0,03	41	2	4,8
0,04	95	7	7,3
0,09	205	31	15,1
0,08	134	18	13,4

Zwischenwert 13,8
EDB 0,15 mm² ± 8,6

0,18	221	88	39,8
0,28	356	47	13,2
0,35	501	197	39,3
0,16	171	26	15,2
0,16	216	11	5,2
0,18	319	33	10,3
0,16	223	6	2,7
0,29	521	15	2,9
0,22	387	13	3,4
0,20	304	21	6,9
0,35	594	103	17,3

Fläche GZ M MZ MI (%)
(mm²)

0,05	64	2	3,1
0,07	82	5	6,1
0,04	51	2	3,9
0,03	39	4	10,3
0,06	88	8	9,1
0,09	218	26	11,9
0,09	117	15	12,8
0,09	124	13	10,5
0,02	26	2	7,7
0,04	70	7	10,0
0,12	143	32	22,3

Zwischenwert 9,8
EDB < 0,15 mm² ± 5,1

0,28	271	26	9,6
0,22	155	35	22,6
0,25	263	20	7,6
0,33	289	39	13,5
0,39	324	36	11,1
0,16	241	19	7,9
0,25	337	49	14,5
0,16	283	13	4,6
0,22	250	14	5,6
0,36	438	50	11,4
0,25	295	50	16,9
0,35	443	51	11,5
0,32	389	44	11,3
0,17	268	23	8,6
1,63	1000	248	24,8
0,54	549	72	13,1
0,72	890	70	7,8
0,41	450	63	14,0
4,29	1000	291	29,1

Fläche GZ MZ
(mm²)

0,10	132	-
0,09	151	4
0,09	100	1
0,03	47	2
0,04	82	-
0,11	298	1
0,09	149	1
0,12	248	9
0,07	128	1
0,12	386	6
0,09	316	29
0,09	216	3
0,09	207	10

Zwischenwert
EDB < 0,15 mm²

0,15	175	7
0,25	313	4
0,22	316	6
0,22	437	1
0,23	396	3
0,25	385	15
0,22	725	8
0,35	1000	31
0,25	866	14
0,15	405	18
0,69	898	32
0,41	441	2
0,41	639	19
0,69	1000	41
3,04	1000	95
0,80	1000	49
0,41	941	87

14,0 ± 10,4
n = 30

11,8 ± 6,2
n = 30

100 Tage nach Teilhep.

160 Tage nach Teilhep.

MI (%)	Fläche (mm ²)	GZ	MZ	MI (%)	Fläche (mm ²)	GZ	MZ	MI (%)	
-,-	0,12	196	16	8,1	0,05	57	1	1,7	
2,6	0,07	121	8	6,6	0,12	150	1	0,6	
1,0	0,04	71	1	1,4	0,09	283	15	5,3	
4,2	0,10	310	16	5,2	0,09	216	9	4,1	
-,-	0,07	181	14	7,7	0,07	165	8	4,8	
0,3	0,04	48	7	14,6	0,06	100	9	9,0	
0,7	0,11	116	4	3,4	0,12	201	21	10,4	
3,6	0,09	231	17	7,4	0,09	397	41	10,3	
0,8	0,06	169	9	5,3	0,03	57	8	14,0	
1,6	0,12	231	23	10,0	0,09	189	16	8,4	
9,1	0,06	104	4	3,8	Zwischenwert				6,9
1,4	Zwischenwert				EDB < 0,15 mm ²				± 4,3
4,8	EDB < 0,15 mm ²								± 4,3
2,3	0,15	305	18	5,9	0,22	311	6	1,9	
± 2,6	0,17	403	11	2,7	0,25	341	32	9,4	
4,0	0,15	235	16	6,8	0,20	235	5	2,1	
1,3	0,35	455	49	10,8	0,15	192	24	12,5	
1,9	0,23	573	18	3,1	0,15	281	5	1,7	
0,2	0,25	333	11	3,3	0,17	449	14	3,1	
0,8	0,18	351	15	4,3	0,17	368	43	1,2	
3,9	0,17	359	8	2,2	0,29	506	26	5,1	
1,1	0,24	287	15	5,2	0,17	289	54	18,6	
3,1	0,28	268	31	11,6	0,15	193	19	9,8	
1,6	0,26	398	32	8,0	0,29	344	33	9,6	
4,4	0,15	189	12	6,3	0,15	211	27	12,7	
3,5	0,23	1000	224	22,4	0,65	882	191	21,7	
0,4	0,35	717	57	7,9	0,30	657	60	9,1	
2,9	0,17	380	28	7,3	0,25	426	12	2,8	
4,1	0,26	420	27	6,4	0,22	424	63	14,8	
9,5	0,22	808	58	7,2	0,18	685	51	7,4	
4,9	0,40	484	38	7,8	0,40	409	9	2,2	
9,2	6,72	1000	138	13,8	0,98	1000	13	1,3	
	0,78	1000	64	6,4	1,52	1000	38	3,8	
	0,40	742	28	3,8	0,51	620	11	1,8	
	0,58	997	38	3,8	0,40	998	81	8,1	
	0,46	875	43	4,9	0,64	1000	52	5,2	
	0,80	578	68	11,7	1,01	1000	63	6,3	
	0,72	775	60	7,7	1,84	1000	113	11,3	
	1,63	1000	135	13,5	0,43	565	78	13,8	
	1,88	1000	115	11,5	0,51	702	48	6,8	
	0,54	1000	90	9,0	1,31	1000	85	8,5	
	0,87	1000	94	9,4	0,65	1000	133	13,3	
					0,94	1000	63	6,3	

2,9 ± 2,6

n = 30

7,5 ± 4,0

n = 40

7,5 ± 5,0

n = 40

Tab. 4

10 Tage nach Teilhep.

40 Tage nach Teilhep.

Fläche (mm ²)	GZ	MZ	MI (%)	Fläche (mm ²)	GZ	MZ	MI (%)
0,09	98	6	6,1	0,11	216	2	0,9
0,13	156	27	17,3	0,12	273	15	5,5
0,05	73	12	16,4	0,04	106	7	6,6
0,07	91	12	13,1	0,07	125	3	2,4
0,06	102	19	18,6	0,09	156	2	1,3
0,08	100	22	22,0	0,12	242	1	0,4
0,06	73	3	4,1	0,07	136	3	2,2
0,06	65	12	18,4	Zwischenwert			2,8
0,03	35	11	31,4	EDB < 0,15 mm ²			± 2,3
0,09	78	34	43,6	0,15	372	15	4,0
0,04	101	11	10,9	0,22	344	10	2,9
0,06	119	32	26,8	0,36	514	8	1,5
0,13	342	67	19,6	0,15	171	1	0,6
0,13	312	101	32,4	0,15	257	6	2,3
Zwischenwert			20,1	0,15	342	16	4,7
EDB < 0,15 mm ²			± 10,7	0,23	444	3	0,7
0,15	253	53	20,9	0,35	598	10	1,7
0,35	353	26	7,3	3,04	1000	65	6,5
0,15	308	109	35,4	0,64	844	166	19,6
0,15	186	53	28,5	0,50	1000	77	7,7
0,98	462	22	4,7	1,13	1000	17	1,7
0,22	319	75	23,5	0,50	749	36	4,8

20,1 ± 10,8
n = 20

3,9 ± 4,4
n = 20

60 Tage nach Teilhep.

70 Tage nach Teilhep.

Fläche (mm²) GZ MZ MI (%)

0,10	185	3	1,6
0,11	229	9	3,9
0,04	181	3	1,6
0,12	335	13	3,9
0,07	270	24	8,9
0,09	232	13	5,6
0,04	191	11	5,7
0,12	307	9	2,9
0,03	75	5	6,7
0,04	169	7	4,1
0,08	250	5	2,0
0,12	334	31	9,3
0,09	198	16	8,1
0,04	84	3	3,6
0,09	264	5	1,9
0,12	362	24	6,6
0,09	196	25	12,7

Zwischenwert
EDB < 0,15 mm² ± 5,2
± 3,1

0,35	846	13	1,5
0,18	363	6	1,6
0,17	289	15	5,1
0,29	598	12	2,0
0,35	795	25	3,1
0,36	596	36	6,0
0,15	423	19	4,5
0,35	846	28	3,3
0,29	645	17	2,6
0,26	589	37	6,3
0,20	535	19	3,5
0,16	304	9	3,0
0,17	222	9	4,0
0,25	390	24	6,1
0,29	539	140	25,9
0,65	1000	53	5,3
2,17	1000	131	13,1
1,84	1000	106	10,6
0,50	981	85	8,6
0,72	1000	164	16,4
2,08	1000	132	13,2
0,46	834	120	14,4
0,65	1000	48	4,8

Fläche (mm²) GZ MZ MI (%)

0,11	268	3	1,1
0,09	236	11	4,7
0,09	271	1	0,4
0,07	176	-	-,-
0,12	191	1	0,5
0,11	254	7	2,7
0,10	280	2	0,7
0,04	89	5	5,6
0,13	382	24	6,2
0,09	168	34	20,2
0,07	134	6	4,4
0,11	247	7	2,8
0,04	73	3	4,1
0,09	293	12	4,0
0,12	285	23	8,1

Zwischenwert
EDB < 0,15 mm² ± 4,3
± 5,1

0,16	560	4	0,7
0,17	493	7	1,4
0,17	522	4	0,8
0,26	723	2	0,3
0,29	873	5	0,6
0,17	530	17	3,2
0,22	517	4	0,8
0,29	1000	78	7,8
0,22	532	31	5,8
0,35	480	29	6,0
0,29	777	25	3,2
0,18	373	4	1,0
0,35	605	30	4,9
0,39	1000	13	1,3
0,50	1000	11	1,1
1,95	1000	38	3,8
1,37	1000	43	4,3
0,72	1000	9	0,9
0,61	747	21	2,8
0,91	1000	64	6,4
0,51	804	83	10,3
0,43	643	32	4,9
23,48	1000	90	9,0
0,58	1000	28	2,8
2,17	1000	138	13,8

6,4 ± 4,9
n = 40

4,1 ± 4,0
n = 40

Tabelle 3: ^3H - TdR - MI (%) in den ATPase defizienten EDB und den EDB einer Größe $< 0,15 \text{ mm}^2$. Zusätzlich sind die EDB - Fläche, die Anzahl der gezählten Hepatocyten (GZ) und die Anzahl der markierten Hepatocyten (MZ) angegeben. Die Spalten entsprechen dem 10., 40., 70., 100. und 160. Tag nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 60 Tage lang 5 mg Döna/kg/Tag erhalten und wurden anschließend teilhepatektomiert. Die Stichprobenwerte basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. n = Stichprobenumfang.

Tabelle 4: ^3H - TdR - MI (%) in den ATPase defizienten EDB und den EDB einer Größe $< 0,15 \text{ mm}^2$. Zusätzlich sind die EDB - Fläche, die Anzahl der gezählten Hepatocyten (GZ) und die Anzahl der markierten Hepatocyten (MZ) angegeben. Die Spalten entsprechen dem 10., 40., 60. und 70. Tag nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 90 Tage lang 5 mg Döna/kg/Tag erhalten und wurden anschließend teilhepatektomiert. Die Stichprobenwerte basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. n = Stichprobenumfang.

Tabelle 5:

Tier	Tage nach Teilhepatektomie				
	10	40	70	100	160
1	1,6	1,6	0,4	1,6	1,0
2	2,4	1,5	0,9	1,5	3,8
3	1,1	1,1	0,4		
$\bar{x}$	1,7	1,4	0,6	1,6	2,4
s	0,6	0,3	0,3	0,1	1,9
n	3	3	3	2	2

Tab. 5: ^3H - TdR - MI (%) im Gesamtparenchym der regenerierenden Leber unter Aussparung der EDB nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 60 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag erhalten. Die Markierung erfolgte in beschriebener Weise. Die Stichproben basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung von jeweils 10 000 Zellen.

n = Stichprobenumfang

$\bar{x}$ = Mittelwert einer Stichprobe

s = Standardabweichung

Tabelle 6:

Tier	Tage nach Teilhepatektomie			
	10	40	60	70
1	4,5	0,6	0,97	1,4
2	1,9	0,4	0,99	1,8
3	9,5			1,2
$\bar{x}$	5,3	0,5	0,98	1,5
s	3,7	0,1	0,1	0,4
n	3	2	2	3

Tab. 6: ^3H - TdR - MI (%) im Gesamtparenchym der regenerierenden Leber unter Aussparung der EDB nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 90 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag erhalten. Die Markierung erfolgte in beschriebener Weise. Die Stichproben basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung von jeweils 10 000 Zellen.

n, $\bar{x}$, s siehe Tabelle 5.

Tabelle 7

Tage nach Tage nach 2/3 Hepat. Beginn der Däna-Fütterung		Todesursache bzw. makr. Befunde
132	192	Kleiner Lebertumor $\varnothing$ 1,5 mm
141	201	Bronchopneumonie, vereinzelte kleine Lebertumoren bis $\varnothing$ 3 mm.
141	201	Bronchopneumonie, kleine Lebertumoren,
146	206	Bronchopneumonie, in der Leber Tumor $\varnothing$ 0,5cm im Lob. dextr. Lat..
146	206	Bronchopneumonie, Leber o.B..
153	213	Bronchopneumonie, Lebertumoren bis $\varnothing$ 5 mm.
201	261	Lob. medialis vereinzelte kleine Tumor - knötchen, im Lob. sin. lat. 5x4x3 cm Tumor. Im Lob. caudalis 3x3x2 cm Tumor.
207	267	Im Cavalappen hilusnah ein heller Tumor $\varnothing$ 2 cm , im vorderen Proc. papillaris dext. ausgedehnte Tumoren 4,5x3x2 cm, Milz - schwellung.
227	287	In allen nach Teilhepatektomie verbliebenen Leberlappen große helle Lebertumoren. Im Lob. caudalis ein 4x2,5x3 cm großer, teils zystischer Tumor.
272	332	Große Lebertumoren in allen verbliebenen Lappen. Ausgedehnte Lungenmetastasierung.
274	334	Lebertumoren bis $\varnothing$ 1,5 mm mit guter Ab - grenzung gegen das umliegende Gewebe. Netzmetastasen.
280	340	Im vord. Proc. papillaris dext. 4x5x3 cm

		großer Tumor. In beiden Nieren ca $\varnothing$ 2 cm große Tumoren, Netzmetastasen.
297	357	Zahlreiche, große Lebertumoren.
306	366	Lebertumoren,
325	385	Rechte Niere: Tumor $\varnothing$ 1,2 cm, Lebertumor von von 6x4x3 cm, sowie einige kleinere Lebertumoren.
325	385	Großer Lebertumor,
395	455	Pneumonie rechts, am vord. proc. pap. dext. ein Tumor $\varnothing$ 3,5 mm, in den anderen Lappen gut abgrenzbare Tumoren $\varnothing$ 0,5 - 1 cm.

Tabelle 8

Tage nach	Tage nach	Todesursache bzw. makr. Befund
2/3 Hepat.	Beginn der	
	Däna-Fütterung	
23	113	In allen Leberlappen Tumoren bis $\varnothing$ 4mm.
37	127	Pneumonie, Leber von Tumoren durchsetzt.
37	127	Tod durch Verbluten aus einer Zyste am hilusnahen Teil des Proc.Pap.dext..
51	141	Lebertumor im vord.Proc.Pap.dext. 3x3x2 cm Zwei Milztumoren $\varnothing$ 6 mm bzw. $\varnothing$ 5 mm.
51	141	Im vord. Proc.Pap.dext 3x3x2 cm großer Tumor.

Tage nach 2/3 Hepat.	Tage nach Beginn der Däna-Fütterung	Todesursache bzw. makr. Befund
77	167	Im regenerierten Leberrest mehrere Tumoren Ø 5 mm, mehrere Lungenmetastasen, von Ø 5 mm unterhalb der Trachäabifurkation.
87	177	Zwei Lebertumoren von 3x3x2 cm bzw. 3x5x2 cm Größe.
91	181	Lebertumoren Ø 2 cm.
95	185	Lebertumoren bis Ø 5 mm,
95	185	Lebertumoren bis Ø 5 mm.
106	196	Lebertumor 3x4x1,5 cm Größe.
118	208	Lebertumoren in beiden Proc.Pap. dext.,
118	208	Lebertumoren bis Ø 2 cm Größe.
121	211	Zahlreiche bis zu Ø 1 cm große Lebertumoren.
121	211	Im Lob.dext.lat. mehrere Tumoren Ø 1cm bzw. Ø 3 mm, im vord.Proc.Pap.dext. Tumor Ø 1 cm. Im hinteren Proc.Pap.dext. Tumoren bis Ø 2mm. Im Cavalappen 2 Tumoren Ø 2 mm. Zahlreiche Lungenmetastasen.

Tabelle 9

Tage nach Teilhepatektomie

132	23
141	37
141	37
146	51
146	51
153	77
201	87
207	91
227	95
272	95
274	106
280	118
297	118
306	121
325	121
325	
395	

$233,4 \pm 81,8$	$81,9 \pm 34,1$
n = 17	n = 15

Tabelle 9: Überlebenszeiten von Tieren die 60 bzw. 90 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag erhalten hatten, und die anschließend teilhepatektomiert wurden. Es wurden nur solche Tiere in die Statistik aufgenommen, deren Todesursache gesichert war. Links: 60 Tage Däna rechts: 90 Tage Däna. n siehe Tab. 3.

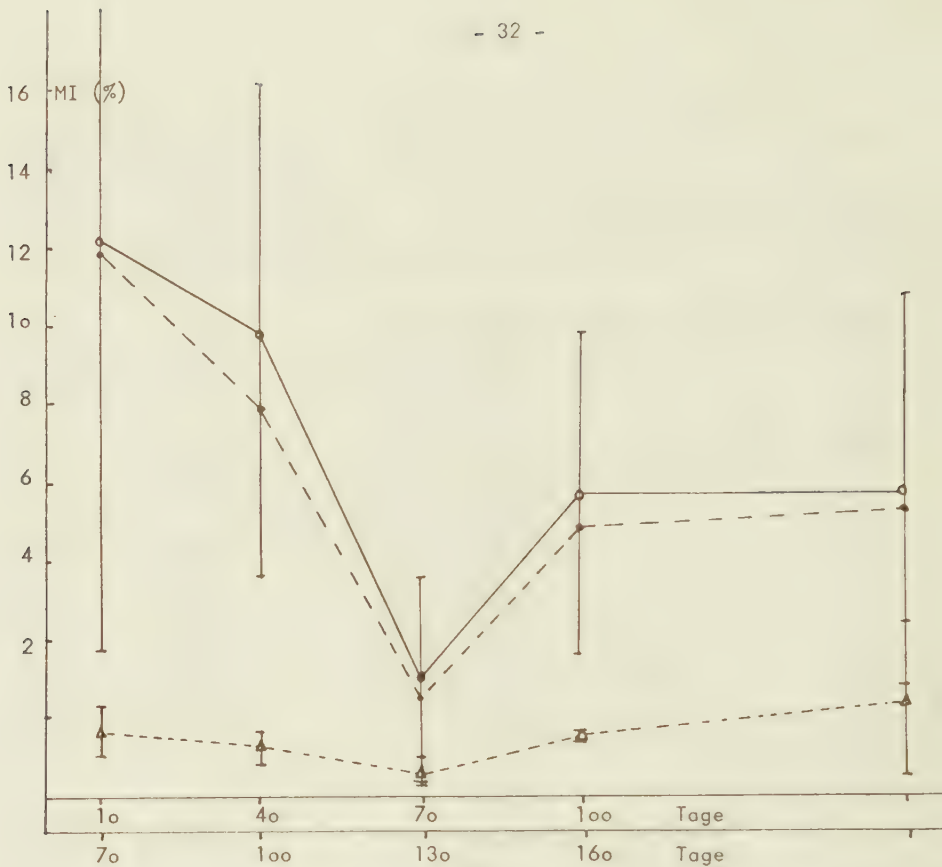


Abb. 1: ^3H - TdR - MI (%) in den ATPase - defizienten EDB, sowie in den EDB einer Größe $< 0,15 \text{ mm}^2$ und dem umliegenden Parenchym der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 60 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag erhalten. Die Markierung erfolgte in beschriebener Weise. Die Stichprobenwerte basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung. Abszisse: oben : Tage nach Teilhepatektomie.

unten: Tage nach Fütterungsbeginn.

Ordinate: prozentualer Anteil der markierten Zellkern in den EDB.

- — — — — ○ = ^3H - TdR - MI in den Gesamt - EDB .
- — — — — ● = ^3H - TdR - MI in den EDB $< 0,15 \text{ mm}^2$.
- △ — — — — △ = ^3H - TdR - MI im umliegenden Parenchym.

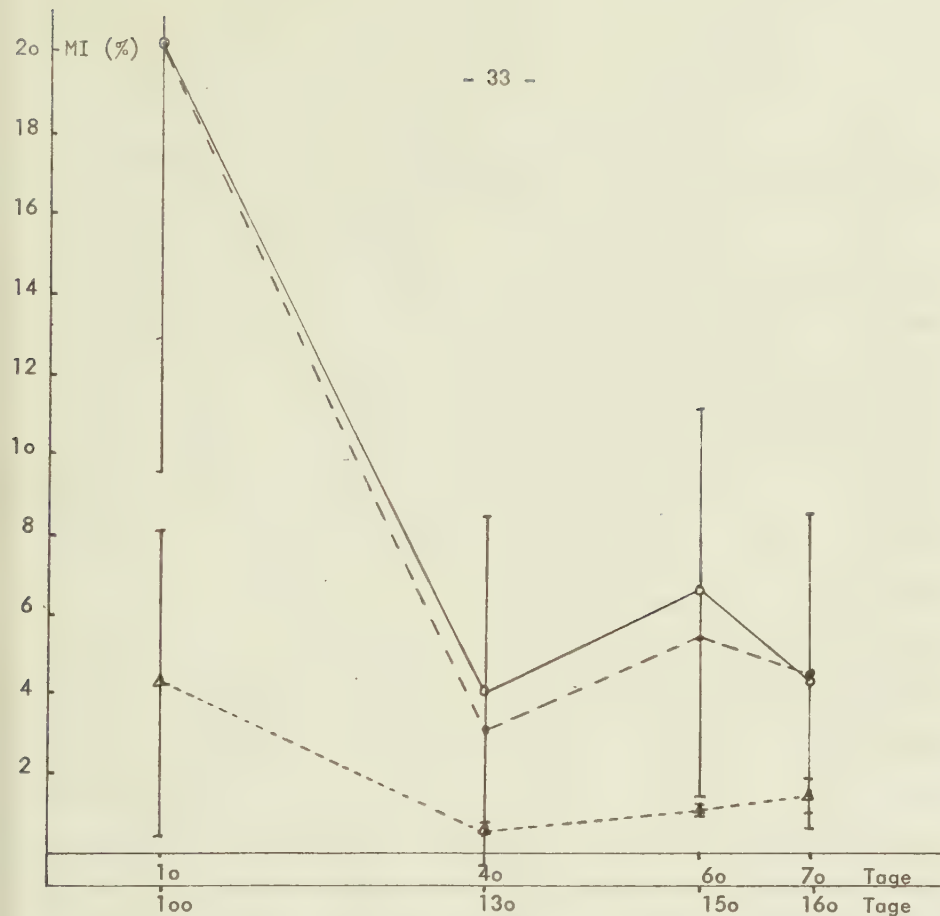


Abb. 2: ^3H - TdR - MI (%) in den ATPase - defizienten EDB, sowie in den EDB einer Größe $< 0,15 \text{ mm}^2$ und dem umliegenden Parenchym der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 90 Tage lang 5 mg Döna/kg/Tag erhalten. Die Markierung erfolgte in beschriebener Weise. Die Stichprobenwerte basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung.

Abszisse: oben : nach Teilhepatektomie.

unten: nach Fütterungsbeginn.

Ordinate: prozentualer Anteil der markierten Zellkerne in den EDB.

- — ○ = ^3H - TdR - MI in den Gesamt - EDB.
- — ● = ^3H - TdR - MI in den EDB $< 0,15 \text{ mm}^2$.
- △ - - - △ = ^3H - TdR - MI im umliegenden Parenchym.

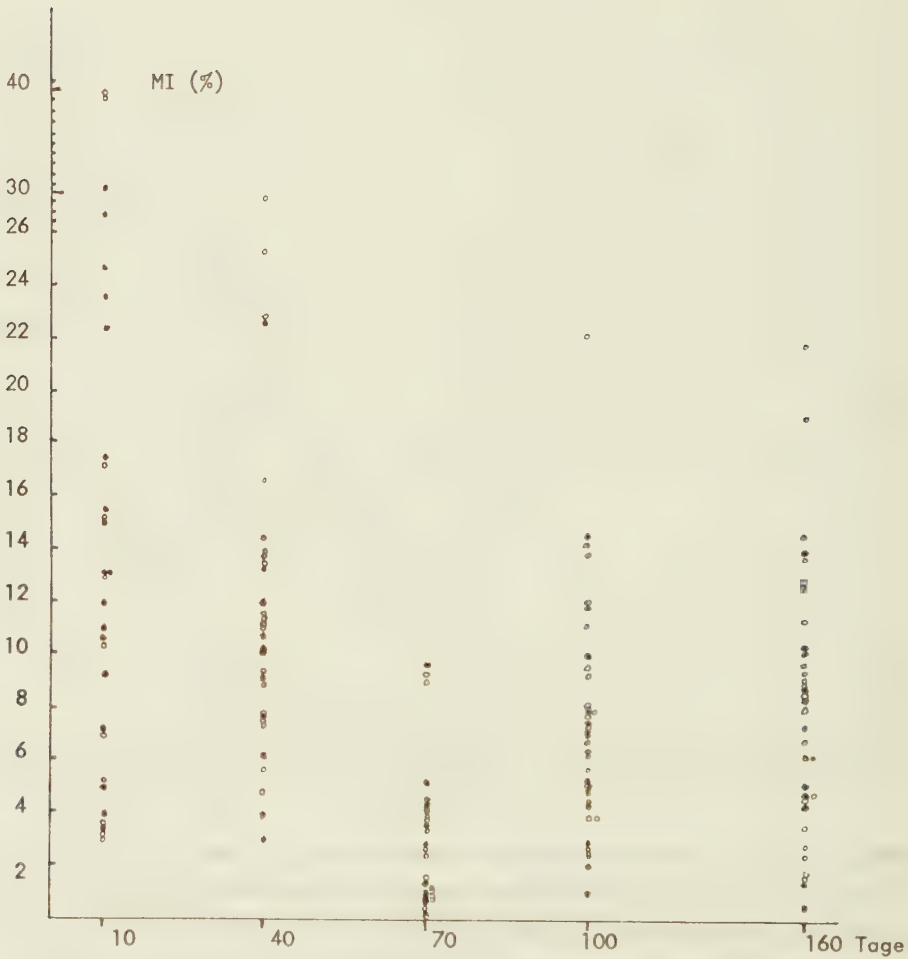


Abb. 3: ^3H - TdR - MI (%) in den ATPase defizienten EDB, sowie in den EDB $< 0,15 \text{ mm}^2$ der regenerierenden Leber. Die Tiere hatten zuvor 60 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag erhalten. Die Markierung erfolgte in beschriebener Weise. Die Stichprobenwerte basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung. • = MI in den EDB $< 0,15 \text{ mm}^2$

Abszisse : Tage nach Teilhepatektomie.

Ordinate: prozentualer Anteil der markierten Zellkerne in den EDB.

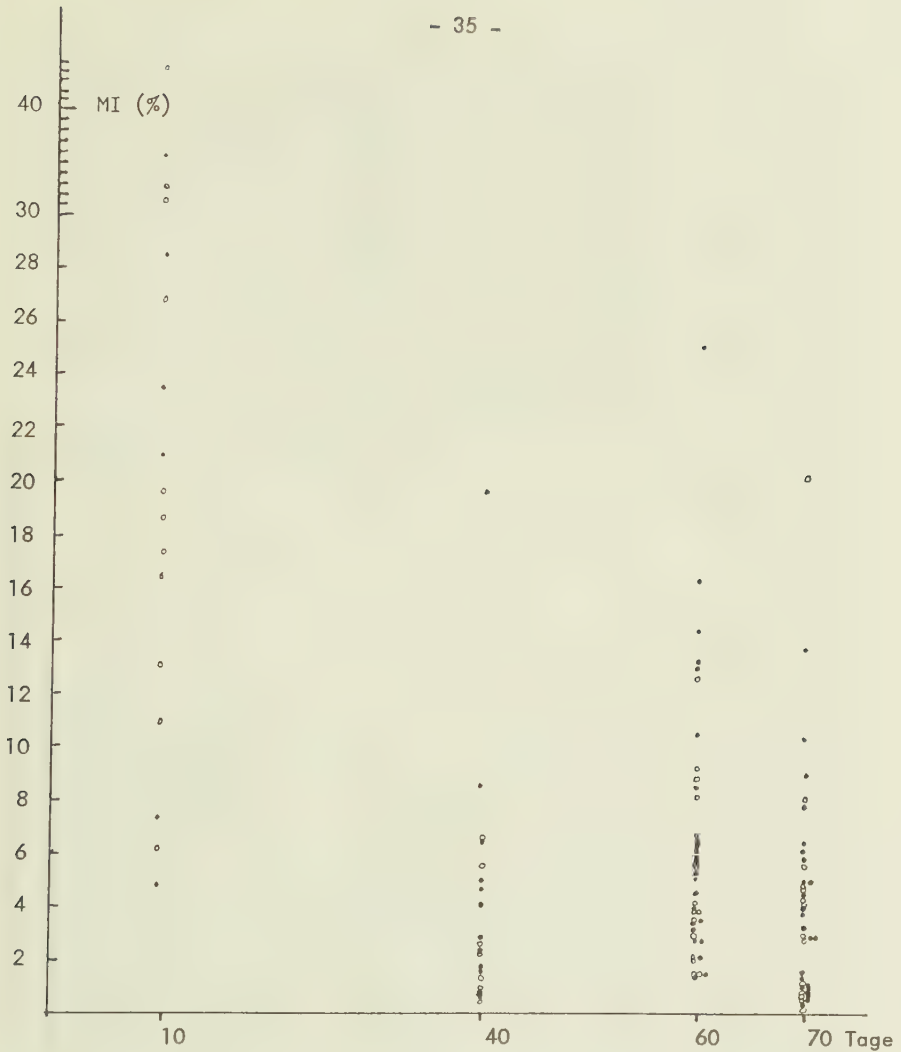


Abb. 4: ^3H - TdR - MI(%) in den ATPase - defizienten EDB, sowie in den EDB $< 0,15 \text{ mm}^2$ der regenerierenden Leber. Die Tiere hatten zuvor 90 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag erhalten. Die Markierung erfolgte in beschriebener Weise. Die Stichprobenwerte basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung. • = MI in den EDB $< 0,15 \text{ mm}^2$.

Abszisse: Tage nach Teilhepatektomie

Ordinate: prozentualer Anteil der markierten Zellkerne in den EDB.

Abb. 5

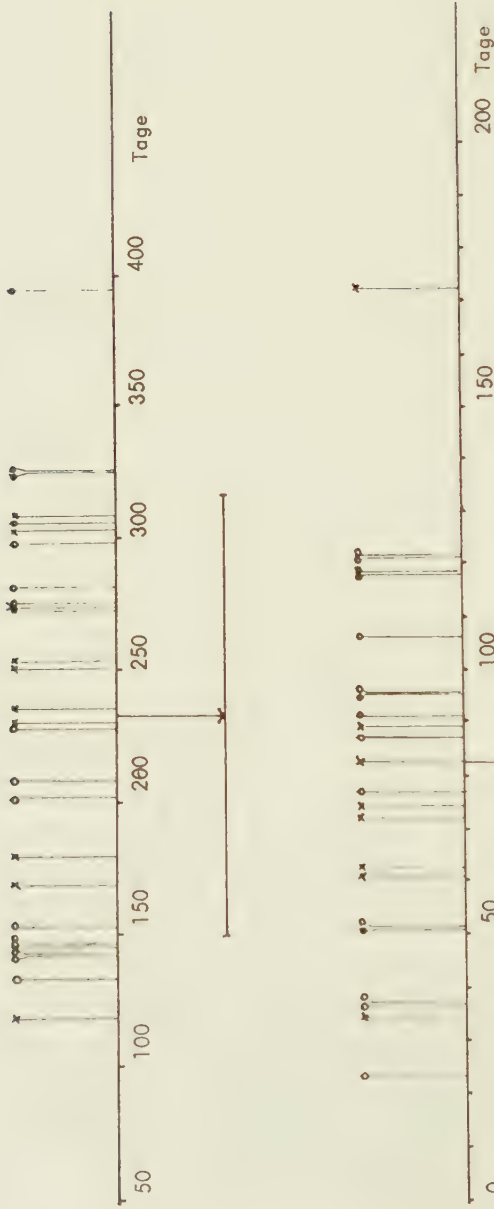


Abb. 5: Absterbedaten der nicht zu autoradiographischen Versuchen verwendeten Ratten nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 5 mg Däna/kg/Tag erhalten (oben 60 Tage, unten 90 Tage lang). Zusätzlich zu den Tieren deren Todesursache bekannt war (9), sind auch noch die Absterbedaten der Tiere aufgeführten Todesursache unbekannt war (*). Beim Pfeilist der mittlere Absterbetag mit Standardabweichung angegeben.

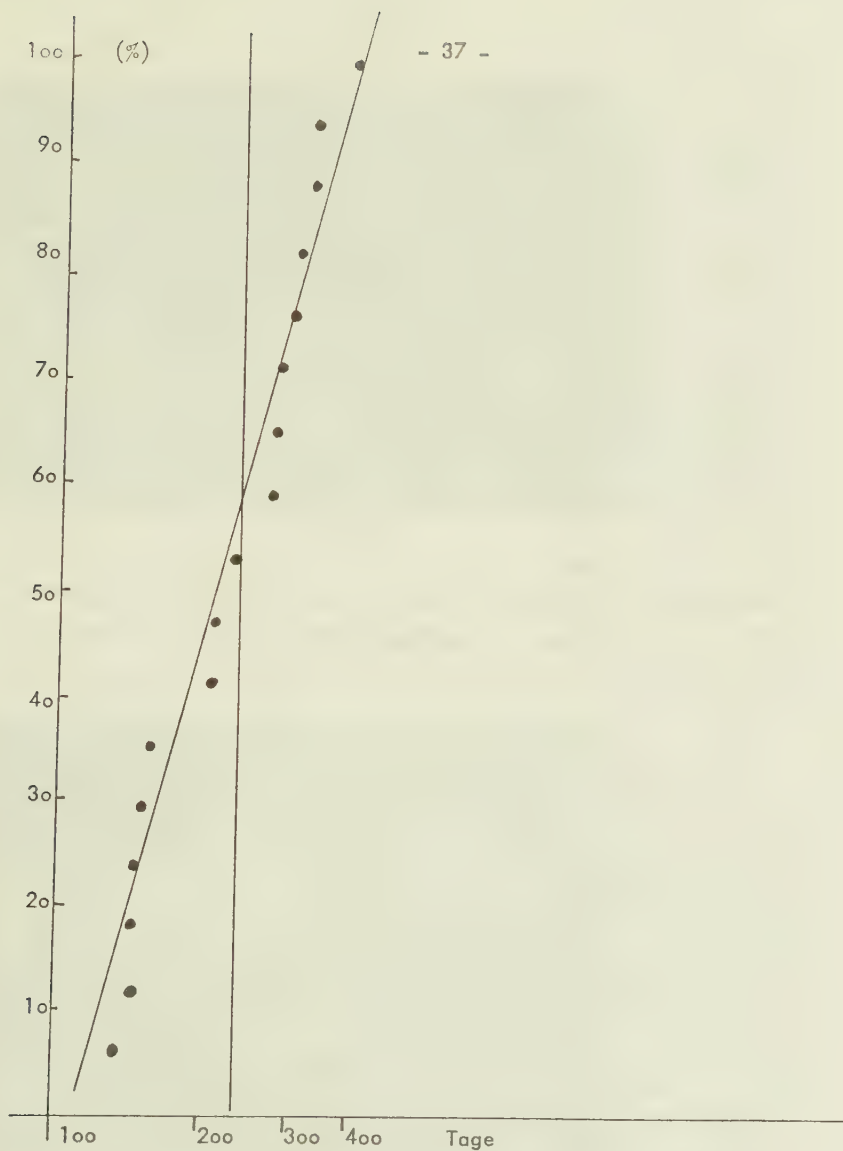


Abb. 6: Absterbedaten der nicht zu autoradiographischen Versuchen verwendeten Ratten nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 60 Tage lang 5 mg Döna/kg/Tag erhalten. In die Statistik aufgenommen wurden nur solche Tiere deren Todesursache bekannt war. Die Gerade entspricht dem mittleren Todestag.

Abzisse: Tage nach Teilhepatektomie (Log. Maßstab).

Ordinate: prozentualer Anteil gestorbener Tiere am Gesamtkollektiv.

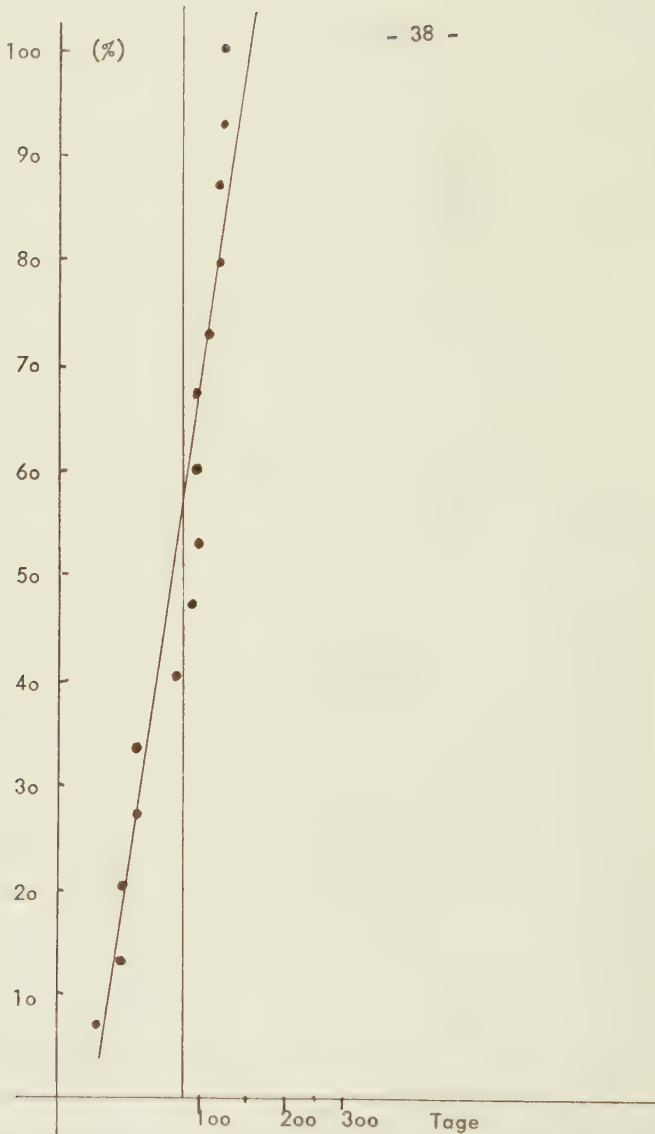


Abb. 7: Absterbedaten der nicht zu autoradiographischen Versuchen verwendeten Ratten nach Teilhepatektomie. Die Tiere hatten zuvor 90 Tage lang 5 mg Däna/kg/Tag erhalten. In die Statistik aufgenommen wurden nur solche Tiere deren Todesursache bekannt war. Die Gerade entspricht dem mittleren Todestag.

Abszisse: Tage nach Teilhepatektomie (Log. Maßstab).

Ordinate: prozentualer Anteil gestorbener Tiere am Gesamtkollektiv.

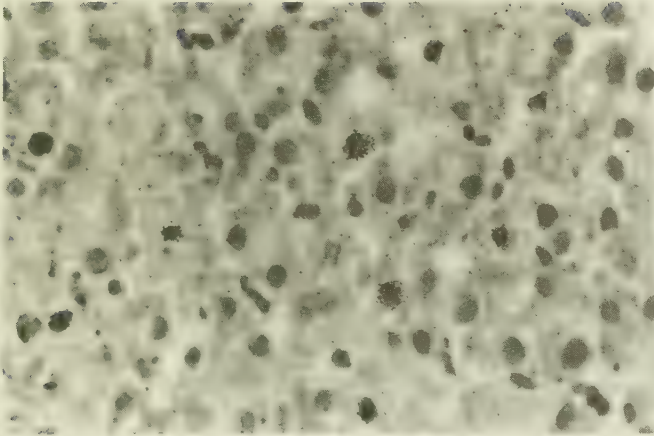


Abb. 8 : Markierte Hepatocytenkerne nach 7 maliger i.p. Injektion von $0,8 \mu \text{Ci } ^3\text{H}$ - Thymidin/g Körpergewicht in Intervallen von 6 Stunden. Todeszeitpunkt nach der letzten Injektion: 1 Stunde.

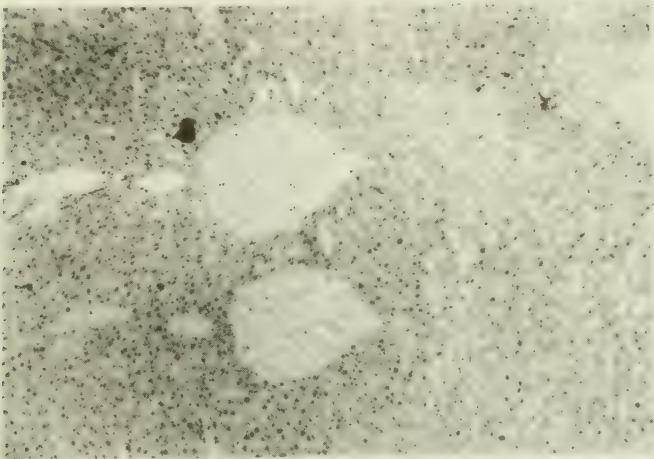


Abb. 9: Demonstration des Versuches, Serienschritte im Vergleichsmikroskop zur annähernden Deckung zu bringen. Die jeweiligen Objektbeleuchtungen sind, wie beschrieben, so eingestellt, daß es zum Durchsichenein des einen Präparates kommt. In der Mitte die einander entsprechenden Gefäße. Durch weiteres Verschieben eines Präparates werden die Objekte deckungsgleich.

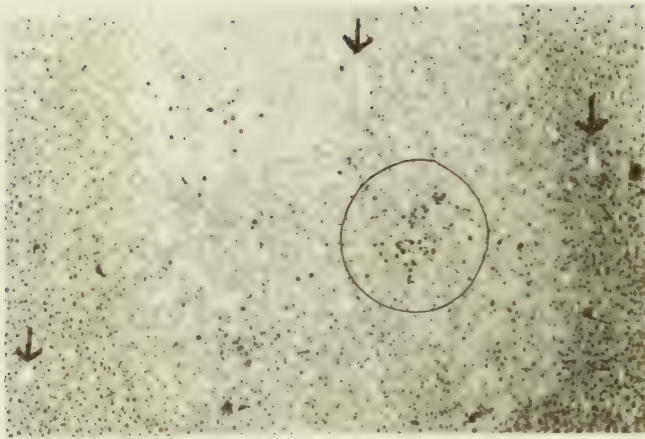


Abb. 10: Hyperplastischer Knoten mit Verdrängung des umliegenden Lebergewebes in einem autoradiographischen Präparat (Hämalaun/Eosin). Innerhalb des HK sieht man deutlich eine Zellpopulation mit erhöhter Inkorporation von ^3H - TdR. (○). Pfeile: Strukturen die mit denen im ATPase defizienten Pendant (vergl. Abb. 11) Übereinstimmen.

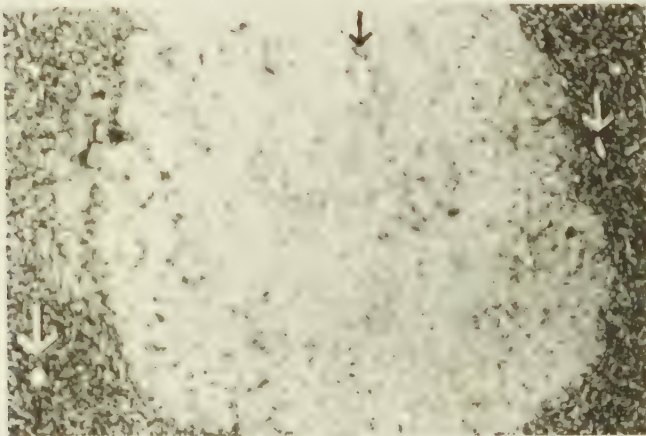


Abb. 11: (vergl. Abb. 10) Serienschchnitt des ATPase defizienten Pendants zur Autoradiographie. Entsprechende Strukturen sind mit Pfeilen bezeichnet.

3. DISKUSSION

3.1. Zur Problematik der mehrfachen Markierung mit ^3H - Thymidin

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Ermittlung des ^3H - Thymidin - Markierungsindex über einen Zeitraum von 36 Stunden in 6 - stündigem Intervall radioaktiv markiertes Thymidin injiziert. Dies führt zum gleichen MI wie eine ^3H - TdR - Dauerinfusion über denselben Zeitraum (Rabes et al 1972). Wählt man das Intervall zwischen den einzelnen Injektionen kürzer als die DNS - Synthese - Phase t_s , welche im Hepatozyten etwa 7,5 Stunden (Rabes et al 1970 a) dauert, so werden bei einer Zellzyklusdauer von $t_c = 33$ Stunden in der regenerierenden Leber (Rabes et al. 1970 a) sämtliche Zellen markiert, die bei der ersten Injektion in die DNS - Synthese eingetreten waren und bei der letzten sich gerade noch in ihr befanden. Alle proliferierenden Zellen würden dabei mindestens einmal die DNS - Synthesephase durch - laufen. Hierdurch werden alle Fehlerquellen, die durch die zeitliche Verschiebung der DNS - Synthesewelle entstehen, eliminiert. Der so gewonnene ^3H - TdR - Markierungsindex gibt eine ungefähre Vorstellung über die Größe der Wachstumsfraktion (Mendelsohn 1962 a, b) während der Döna - Cancerogenese. Da die ersten Versuche 10 Tage, die zweiten 40 Tage nach 2/3 Hepatektomie durchgeführt wurden, liegt bei unserer Versuchsanordnung eine Leber vor, in der die meisten Zellen in Ruhe - phase sein dürften. Nach Harkness (1957), Pack et al. (1962)), hat die Leber nach 10 - 18 Tagen ihre ursprüngliche Größe zurückgewonnen und die relative Häufigkeit der S - Phase - Zellen nimmt ab (Fabrikant 1968). Für die ruhende Leber nehmen Stöcker und Pfeiffer (1967) ein t_s von 18 Stunden an. In der ruhenden Leber übersteigt somit die Zellzykluszeit die radioaktive Versuchszeit um ein Vielfaches. Auch eine Dauerinfusion mit ^3H - Thymidin über 30 Stunden erfasst nur einen Teil der Wachstumsfraktion. Eine mehrmalige ^3H - TdR-Injektion erbringt nach Rabes und Scholze (1972) in der ruhenden Leber gegenüber der Pulsmarkierung lediglich einen um den Faktor 3 erhöhten Markierungsindex (MI).

Toxische Effekte oder Teilsynchronisation und Mitosehemmung, wie sie nach Grisham (1960) vielleicht nach mehrmaliger Thymidininjektion auftreten können, wurden nicht berücksichtigt.

3.2. Zur Problematik der Ermittlung des Markierungsindex in den EDB

Die Tatsache, daß nur ein Teil der EDB gleichmäßig markiert war, viele dagegen Nester gesteigerter Proliferation enthielten, (Abb. 11), zeigt, daß das Wachstumsverhalten in den "Inseln" keineswegs homogen ist (Rabes et al. 1972). Wir können deshalb nicht von "Inselmarkierung" sprechen, sondern sollten genauer den in den EDB enthaltenen Subpopulationen die Aufmerksamkeit schenken.

Das Problem wäre, für die Nester außer dem veränderten Wachstumsverhalten, andere Eigenschaften, wie z.B. die Korrelation zwischen Markerenzym, Zellzyclusdaten, biochemischen oder morphologischen Veränderungen (Newberne 1976) zu finden, um ihnen auf diesem Wege eine potentielle Malignität beizuordnen. So glaubt Karasaki (1976), daß Hyperbasophilie und Veränderungen im Zellzyclus mit Veränderungen in der intrazellulären Homöostase einhergehen. Die hyperbasophilen Bezirke sind auch morphologisch vom umliegenden Parenchym zu unterscheiden. Bannasch (1976) hält es für möglich, daß Präcancerosen, die basophile Zellen enthalten, bereits Carcinome sind.

Auch die Kombination bestimmter Enzyme oder deren Ausfälle (Kitagawa und Pitot 1975) oder die Koinzidenz von Enzymdefekten (Schieferstein et al. 1974) bzw. das Muster von Veränderungen (Friedrich-Frekxa et al. 1969 b), könnten Parameter sein für die Identifizierung von Subpopulationen. Ein weiteres Kriterium wäre das immunologische Verhalten von alterierten Hepatozyten (Friedrich-Frekxa und Hoffmann 1969, Scherer et al. 1975) zu untersuchen.

Da die Enzymdefekte nur Nebenerscheinungen der Cancerogenese sein dürften (Morris und Pitot (vergl. Pitot 1966)), kann man sie allenfalls als Indiz

für ein eventuelles malignes Geschehen werten. Die EDB sind anderer -
seits notwendig zur Orientierung, da die späteren Tumoren in ihrem
Bereich entstehen. (Scherer und Emmelot 1975).

3.3. Erörterung des Kurvenverlaufs der EDB - Markierungsindices

3.3.1. 60 Tage Däna - Fütterung

Die 10 Tage nach Teilhepatektomie ermittelten MIs in den EDB weisen
eine breitgefächerte Streuung auf. Die Werte liegen zwischen 0% und
39,8%(Tab. 3 und 7, Abb.1 und 3). Die mit 1,7% ebenfalls erhöhte
Markierung des umliegenden Parenchyms ist wohl Ausdruck des durch
die Teilhepatektomie gesetzten Wachstumsreizes (Grisham 1962) und
zeigt, daß noch nach 10 Tagen eine regenerative Proliferation statt -
findet. Das stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein
(Fabrikant 1968, Rabes und Tuzek 1970, Weinbren 1959). Die erhöhte
Proliferationsrate sowohl der Parenchym - als auch der EDB - Zellen
hängt möglicherweise auch mit der durch das Däna verursachten Wachs -
tumshemmung zusammen (Rabes et al. 1970, Rubin et al. 1964). Nach
Absetzen des Däna kommt es dann zu einem überschießenden Wachstum
(Rajewsky 1972). Die große Heterogenität der EDB - Markierungsindices
mag auch in der Heterogenität der EDB - Zellen bezüglich ihrer prä -
cancerösen Veränderungen liegen (Bonnasch 1976). Wie aus einer
Arbeit von Metzger (1977) sowie Rabes et al. (1970 b) hervor -
geht, reagieren EDB im frühen Stadium ihrer Genese sehr wohl auf einen
Wachstumsreiz. Es wurde in diesen Arbeiten eine erhöhte Tumoraus -
beute bzw. eine Verkürzung der Überlebenszeit der Versuchstiere er -
zielt.

Auch in der Gruppe der 60 Tage mit Däna gefütterten Tiere gibt es EDB,
die erst zu einem späteren Zeitpunkt der Cancerogenese entstanden sind.
Diese "jungen Inseln" können demnach auf den Wachstumsreiz reagieren,
die "älteren Inseln" haben diese Fähigkeit verloren, und haben ledig -

lich eine erhöhte Basalproliferation (Rabes et al. 1970). Die Fähigkeit auf einen Wachstumsimpuls zu antworten oder nicht scheint demnach kein alternatives Verhalten, sondern ändert sich möglicherweise mit dem "Alter" der Präcancerose.

Am 40. Tag wurde der zweite autoradiographische Versuch durchgeführt. Auch hier ist die Proliferationsrate in den EDB gegenüber der des umliegenden Parenchyms stark erhöht. Im Mittel ist sie jedoch nur noch acht mal so hoch. Auch die Markierung des umliegenden Parenchyms ist höher als die des Parenchyms der intakten Leber. 40 Tage nach Teilhepatektomie dürfte kein regeneratives Wachstum mehr vorhanden sein. Vielleicht ist die erhöhte Proliferation Folge des Unterganges normaler Hepatocyten, die durch das EDB - Wachstum ausgelöst wird. Auf den Zelluntergang würde der Organismus dann mit einem verstärkten Wachstumsimpuls antworten. Da der MI in den EDB in den Versuchen von Rabes et al. (1970 b) bis zum 90. Tag bzw. Friedrich-Frekxa et al (1970 b) und Rabes und Zettler (1974) bis zum 70 - 105. Tag nach Fütterungsbeginn ohne Teilhepatektomie nicht wesentlich höher liegt als im umliegenden Parenchym, dürfte in unserem Falle der relativ niedrige EDB - MI nach Teilhepatektomie dafür sprechen, daß die Teilhepatektomie keinen wesentlichen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Inseln haben.

Allerdings könnte die Abnahme des EDB - MI auch Ausdruck einer immunologischen Abwehr gegen die alterierten Hepatocyten sein. Daß durch Däna erzeugte Präcancerosen möglicherweise antigene Eigenschaften haben, zeigten indirekt Friedrich-Frekxa et al. (1969) und Scherer et al. (1976). Das Wachstum der Zellen könnte somit auf immunologischem Wege gehemmt werden. Auch Farber (1975) schließt einen Einfluß der immunologischen Abwehr auf den Ablauf der Cancerogenese nicht aus.

Nach 70 Tagen Laufzeit fällt der MI in den EDB weiter stark ab. Nur noch 2,9% der Zellen sind markiert. Die auch relativ geringe Standardabweichung zeigt, daß die EDB verhältnismäßig homogen in ihrem Wachstumsverhalten sind. Der Grund für eine weitere Abnahme könnte die noch stärker wirksame immunologische Abwehr gegen potentielle Oberflächenantigene sein. Zu diesem Versuchszeitpunkt hat aber auch die Markierung des umliegenden Parenchyms ein relatives Minimum. Mit 0,6% markierter Hepatocyten ist sie nicht wesentlich höher als in der unbeeinflussten Leber. (Coté et al. (1962), Oehlert und Bloch (1962), Stöcker et al. 1964). Diese Tatsache ist mit immunologischen Vorgängen nicht zu erklären. Vielleicht sind die beiden Kurvenverläufe, der des EDB - MI und der des Parenchym - MI deshalb parallel, weil bis zu diesem Zeitpunkt nach Teilhepatektomie ein abnehmender Wachstumsimpuls auf beide Zellpopulationen, EDB - Zellen und Parenchymzellen, wirksam ist. Das würde heißen, daß die meisten EDB - Zellen noch der homöostatischen Wachstumsregulation unterworfen sind. Die immunologische Abwehr wäre dann nur ein zusätzliches Geschehen.

Da nun auch bereits Nester erhöhter Proliferation in den EDB auftauchen (siehe auch Rabes et al. 1972, Newberne 1976), kann nicht mehr von einer einheitlichen EDB - Markierung gesprochen werden. Möglicherweise unterliegt nur ein Teil der Inselzellen einem immunologischen Block. Da sich nach Schieferstein et al. (1974) im Laufe der Carcinogenese die Antigenität der präcancerös veränderten Hepatocyten abschwächt, und die Antigenität umso schwächer ist, je stärker die präneoplastischen Veränderungen der Zellen sind, könnte man vermuten, daß die Nester erhöhter Proliferation aus einer präcancerös veränderten Zellpopulation bestehen. Wenn sich nachweisen ließe, daß diese Foci auch hyperbasophil sind, würde dies mit den Versuchsergebnissen von Karasaki (1976) und Newberne (1976) übereinstimmen, die diesen Foci eine verstärkte Proliferation zuschreiben.

Eine andere Hypothese (Armitage und Doll 1957) wäre, daß bei der Cancerogenese ein 2 - Schritt - Mechanismus vorliegt. Der erste Schritt wäre eine somatische Mutation, die einen Clon entstehen läßt, der exponentiell wachsend die EDB bildet, der zweite Schritt wäre eine erneute Mutation innerhalb der EDB - Zellpopulation, die zur Entstehung der Carcinome führt. Es wäre denkbar, daß die meisten Folgen eines zweiten Mutationsschrittes mit abgeschwächter Antigenität der Mutationsprodukte sind.

Nach dem 70. Tag nach 2/3 Hepatektomie, dem 130. Tag nach Fütterungsbeginn steigt sowohl der EDB - MI als auch der des umliegenden Parenchyms wieder an, um am 100. Tag nach Teilhepatektomie Werte von 7,5% bzw. 1,6% zu erreichen. Der Grund für diesen Anstieg könnte ein Wachstumsimpuls sein, ausgelöst durch Zellnekrosen, die einerseits durch untergehende EDB - Hepatocyten, andererseits durch die weitere Ausbreitung der EDB bewirkt werden. Zellnekrosen sind in den EDB in unseren Präparaten nachweisbar. Ein derartiger Wachstumsimpuls könnte von den Parenchymzellen beantwortet werden. Hierfür spricht die steigende Markierung des Parenchyms. Diejenigen EDB - Zellen, die noch der homöostatischen Wachstumsregulation unterworfen sind antworten jedoch nicht ausnahmslos auf diesen Impuls. Als Grund hierfür ist wiederum eine immunologisch bedingte Proliferationshemmung zu diskutieren. Ob der steigende EDB - MI nur dadurch zustande kommt, weil nun autonome Zellgruppen innerhalb der EDB entstanden sind (Bannasch 1976, Karasaki 1976) die unabhängig von einer übergeordneten Regulation proliferieren, sei dahingestellt. Möglich wäre, daß einzelne Subpopulationen auch in späteren Stadien der Tumoraltenzzeit einen Wachstumsreiz beantworten können. Die Ergebnisse von Rabes et al. (1970 b) widersprechen allerdings dieser Hypothese. Die Autoren zeigen, daß EDB - Zellen zu einem späten Zeit -

punkt der Cancerogenese einen Wachstumsimpuls nur noch mit Einschränkung beantworten. Da aber ein sehr heterogenes Verhalten der EDB - Zellen bezüglich ihrer Wachstumskinetik zu beobachten ist, wäre es denkbar, daß beide Möglichkeiten des Proliferations - verhaltens bestehen.

Der letzte Versuch wurde in der Gruppe der 60 Tage Düna gefütterten Tiere am 160. Tag nach 2/3 Hepatektomie durchgeführt. Der EDB - MI ist nicht weiter gestiegen, im Unterschied zur Parenchymmarkierung. Der MI der EDB beträgt auch jetzt noch 7,5%, die Markierung des um - liegenden Parenchyms ist deutlich gestiegen und beträgt jetzt 2,4%. Die Gründe für dieses Verhalten dürften die gleichen, oben erwähnten sein. Nur scheinen zu diesem Zeitpunkt noch mehr EDB - Zellen die Fähigkeit verloren zu haben, auf den Wachstumsimpuls zu antworten. Der EDB - MI wird nun anscheinend weitgehend von autonomem Wachstum bestimmt.

3.3.2. 90 Tage Düna - Fütterung

Im wesentlichen verläuft der MI in dieser Gruppe mit dem der 60 Tage gefütterten Tiere parallel (Tab. 4 und 6, Abb. 2 und 4). Am 10. Tag fällt ebenfalls die große Streubreite auf. Hier bewegen sich die Werte zwischen 4,1% und 43,6%. Aus dem gleichen Grund wie in der anderen Gruppe ist auch das umliegende Parenchym mit 5,3% höher markiert, als in der unbehandelten Leber. Am 40. Tag nach Teil - hepatektomie, was dem 130. Tag nach Fütterungsbeginn entspricht, tritt das gleiche Minimum der EDB - Markierung mit 3,4% markierter Hepato - cyten und eine geringe Streubreite der Werte auf.

Am 60. Tag steigt der MI in den EDB wieder an, ebenso wie der des Parenchyms, um am 70. Tag wieder abzufallen. In diesem Punkt unter -

scheiden sich die Kurvenverläufe. Das mag daran liegen, daß in der Gruppe der 90 Tage gefütterten Tiere andere Versuchszeitpunkte nach Teilhepatektomie gewählt wurden als in der Gruppe der 60 Tage gefütterten. Die Markierung des umliegenden Parenchyms steigt jedoch weiter an, und ist somit wieder parallel zu der in der anderen Gruppe. Der Grund für die Parallelität der Kurvenpaare, EDB - MI und Parenchym - EDB dürfte der gleiche sein, wie in der Gruppe der 60 Tage gefütterten Tiere beschrieben wurde.

3.4. Zusammenfassende Betrachtung der Kurvenverläufe

Da die Teilhepatektomie auf EDB bzw. alterierte Hepatozyten, zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Genese trifft (Anthony 1976), nämlich nach 60 bzw. 90 Tagen Däna-Dauerfütterung, und diese sich in ihren präcancerösen Veränderungen unterscheiden dürften (Bonnasch 1976, Newberne 1976), möchte man annehmen, daß die EDB - Zellen der 60 Tage gefütterten Tiere anders auf einen Wachstumsreiz antworten, als die der 90 Tage gefütterten Ratten. Nimmt man außerdem an, daß zu jedem Zeitpunkt der Däna - Cancerogenese neue alterierte Hepatozyten entstehen, aus denen sich später EDB entwickeln, so müßten sowohl in der Gruppe der 60 Tage gefütterten Tiere, als auch in der der 90 Tage gefütterten EDB vorhanden sein, die 10, 20, 40, usw. Tage alt sind. Nimmt man weiter an, daß auf Grund der Wachstumskinetik der Inseln (Scherer und Hoffmann 1972, Schieferstein et al. 1974) kleine Inseln "jünger" als große sein müßten, so müßten die 15 bzw. 30 Tage alten EDB, also kleinen EDB, das gleiche Wachstumsverhalten zeigen, wie die EDB, die nach 15 und 30 Tagen Däna - Fütterung von Metzger (1977) untersucht wurden. Das ist jedoch nicht der Fall. Die kleinen EDB zeichnen sich zwar durch einen im Mittel geringeren MI aus als der Durchschnitts - MI in beiden Gruppen, der Kurvenverlauf ist jedoch völlig parallel zu

dem MI sämtlicher EDB (Tab. 3, 4, Abb. 1 und 2). Möglicherweise ist dieses Phänomen mit der Wechselbeziehung zwischen den großen, "älteren" EDB und dem Organismus zu erklären. Die möglicherweise durch die "älteren" EDB induzierte, immunologische Abwehr beeinflusst auch das Wachstum der kleinen, "jüngeren" EDB, deren Antigenität zu schwach ist, um eine wirksame Antikörperinduktion zu bewirken.

Abschließend läßt sich wohl aus den obigen Überlegungen und der Parallellität der drei Kurvenpaare, Gesamt - EDB - MI, MI der kleinen EDB und MI des umliegenden Parenchyms in beiden Tiergruppen, die Tatsache ableiten, daß das Wachstumsgeschehen in den präcancerös veränderten Bezirken durch eine Teilhepatektomie nicht anders beeinflußt wurde, als im unveränderten Parenchym, und bis zu den Zeitpunkten unserer Untersuchungen noch von übergeordneten Regulationen bestimmt wird. Ob als übergeordnetes System die homöostatische Wachstumsregulation oder die immunologische Abwehr die entscheidende Rolle spielt, konnte mit unserer Methode nicht ermittelt werden.

3.5. Zu den Überlebenszeiten der Kontrolltiere

Die Tiere die 60 Tage lang Däna erhalten hatten, überlebten die 2/3 Hepatektomie um $229,9 \pm 74,2$ Tage, diejenigen, die 90 Tage mit Däna gefüttert wurden, $81,6 \pm 35,5$ Tage. Da nicht bei allen Tieren die Todesursache festgestellt werden konnte, wurden nur Tiere mit gesicherten Befunden in die Statistik aufgenommen. Die bereinigten Überlebenszeiten sind $233,4 \pm 81,8$ Tage bzw. $81,9 \pm 34,1$ Tage nach Hepatektomie und $293,4 \pm 81,8$ Tage bzw. $171,9 \pm 34,1$ Tage nach Fütterungsbeginn (Tab. 9 und Abb. 6, 8). Natürlich sind die hepatocellulären Carcinome, die dann zum Tode der Tiere führten, schon früher entstanden. Die Überlebenszeit der Kontrolltiere ist somit nur ein sehr grober Parameter, um Aufschluß über die maligne

Transformation in den EDB - Zellen zu erhalten. Möglicherweise fällt das Auftreten der ersten Mikrocarcinome mit dem 130. Tag nach Fütterungsbeginn zusammen. Friedrich-Frekso et al. (1969 a) fanden bei Dauerfütterung mit 5 mg Däna/kg/Tag nach 140 Tagen typische Carcinome in trabeculärer und tubulärer Anordnung und daneben solide und entdifferenzierte Tumoren. Bis zu diesem Zeitpunkt sind in der Gruppe der 60 Tage mit Däna gefütterten Tiere noch keine Todesfälle aufgetreten und bei den 90 Tage gefütterten Tieren nur wenige. Es scheinen somit vor dem oben erwähnten Termin keine Tumoren im fortgeschrittenen Stadium vorhanden gewesen zu sein, die ein Absterben des betreffenden Tieres verursacht hätten können. In der Gruppe der 90 Tage gefütterten Tiere mag es einige Ausnahmen gegeben haben.

Aus einem Versuch von Rabes und Zettler (1974) geht hervor, daß 60 bzw. 90 Tage Däna gefütterte Tiere ohne 2/3 Hepatektomie ca. 280 bzw. 160 Tage nach Fütterungsbeginn starben. Auch ein Versuch von Rajewsky et al. (1966), die die Ratten 82 Tage lang mit 5 mg Däna/kg/Tag gefüttert hatten zeigt, daß eine dann gesetzte Teilhepatektomie keine signifikante Beeinflussung der Tumorausbeute erbrachte. Die Wachstumskinetik der EDB - Zellen und deren Tendenz zu entarten, sowie der Todeszeitpunkt der Tiere scheinen vor Absetzen des Däna in unseren beiden Tiergruppen im wesentlichen vorgegeben zu sein.

3.6. Abschlußüberlegungen

Ein wichtiges Ergebnis aus den Versuchen scheint die Beobachtung, daß der Enzymdefektbezirk im fortgeschrittenen Stadium der chemisch induzierten Lebercancerogenese ein zwar als Voraussetzung für die Entwicklung von Carcinomen notwendiges, aber sicher kein hinreichendes Modell zur lückenlosen Verfolgung präneoplastischer Veränderungen

auf ihrem Weg zum voll ausgebildeten hepatocellulären Carcinom ist. Wie bereits erwähnt wurde, gibt es außer einer Fülle von Alterationen in der Enzymsausstattung eine Reihe von weiteren Veränderungen histochemischer, morphologischer und immunologischer Natur, deren Zusammenspiel näheres über die potentielle Malignität eines Hepato - cyten aussagen und das heterogene Proliferationsgeschehen in den EDB besser beurteilbar machen könnte (siehe auch Newberne 1976).

Weiterhin ergibt sich aus der Heterogenität der Versuchsergebnisse, daß die Dauerfütterung nicht geeignet ist, eine gleichwertige EDB - population zu schaffen. Da die hepatocellulären Tumoren offenbar durch schrittweise Veränderungen aus normalen Zellen entstehen (Nakahara 1961, Boutwell 1964, Armitage und Doll 1961, Farber 1973), ist anzunehmen, daß z.B. während einer Däna - Dauerfütterung von 60 Tagen ständig neue EDB entstehen und sich die neu entstandenen EDB - Zellen ständig verändern. Nach 60 Tagen läge dann eine Fülle, in ihren Veränderungen verschiedene EDB nebeneinandervor, die vielleicht nur den Mangel an Glucose - 6 - Phosphatase und ATPase gemeinsam haben.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Dauerfütterung des Cancerogens Diäthylnitrosamin (Däna) lassen sich bei einer Dosierung von 5 mg Däna/kg/Tag bei der Ratte hepato - celluläre Carcinome erzeugen. Nach einer Latenzzeit von etwa 130 - 150 Tagen sterben die Tiere dann an den Folgen der cancerösen Ver - änderungen. Im Laufe dieser Latenz lassen sich in bestimmten Zell - gruppen der Leber der Versuchstiere Alterationen histochemischer, morphologischer und proliferationskinetischer Natur nachweisen. Diese Zellpopulationen können mit enzymhistochemischen und autoradio -

graphischen Methoden analysiert werden.

Wenn man durch eine standardisierte Teilhepatektomie einen starken Wachstumsreiz auf die Leber ausübt, wird eine Welle von Mitosen in den Hepatocyten der Restleber ausgelöst. Innerhalb kürzester Zeit ist das ursprüngliche Gewicht der Leber wieder erreicht, und die Zahl der Mitosen nimmt erheblich ab.

Zu untersuchen, wie sich ein Wachstumsreiz auf eine präneoplastische Zellpopulation auswirkt und ihre Proliferationskinetik beeinflusst, war das Anliegen der vorliegenden Arbeit. Weiterhin sollte die Wirkung der Teilhepatektomie auf die Überlebenszeit von Versuchstieren, durch Zuhilfenahme von Vergleichszahlen, untersucht werden.

Adulte, männliche Ratten (Wistar AF/Han) erhielten für 60 bzw. 90 Tage 5 mg Däna/kg/Tag im Trinkwasser. Nach Ablauf der Cancerogen - fütterung wurden sämtliche Tiere 2/3 hepatektomiert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Teilhepatektomie wurde den Tieren 7 mal in 6 - stündigem Intervall ^3H - TdR injiziert. 37 Stunden nach der ersten Injektion wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet. Mit dieser Methode kann man die DNS - synthetisierenden Zellen markieren und die Proliferationskinetik von Zellpopulationen bestimmen.

Aus den Lebern der getöteten Tiere wurden Kryostatserienschnitte hergestellt, die alternierend zur histochemischen Darstellung der ATPase und G - 6 - Pase, sowie zur Herstellung von Autoradiographien verwendet wurden.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Maskenver - gleichsmikroskops. Mit diesem Gerät konnten die Enzympräparate und die Autoradiographien zur optischen Deckung gebracht werden.

Auf diese Weise wurde die Proliferationskinetik innerhalb der Enzym - defektbezirke (EDB) und im umliegenden Parenchym zu den jeweiligen Versuchs-

zeitpunkten bestimmt. Der Markierungsindex (MI) ergab sich dabei aus der Zahl der markierten Zellkerne zur Anzahl der Zellkerne/EDB. Bei der statistischen Auswertung wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

Kontrollgruppen wurden 60 Tage bzw. 90 Tage lang mit Däna gefüttert, teilhepatektomiert und ohne weitere Behandlung beobachtet. Der Todeszeitpunkt wurde registriert. Aus den Organen dieser Kontrolltiere wurden Paraffinschnitte zur histologischen Untersuchung hergestellt.

Nach 60 - tägiger Däna - Fütterung und anschließender Teil - hepatektomie war der MI am 10. postoperativen Tag sowohl in den EDB als auch im umliegenden Parenchym stark erhöht. In den EDB fand sich eine große Streuung der Werte. Zum 40. Tag sank der MI in den EDB etwas ab, um am 70. postoperativen Tag ein Minimum mit einer nur geringen Standardabweichung zu erreichen. Am 100. Tag war der MI wieder angestiegen, am 160. Tag hatte er den gleichen Wert wie am 100. Tag. Der MI des umliegenden Parenchyms war zwar deutlich niedriger als in den EDB, der Verlauf jedoch annähernd parallel.

Nach 90 tägiger Fütterung und anschließender Teilhepatektomie war der MI der EDB, als auch der des umliegenden Parenchyms stark erhöht. Die Standardabweichung war an diesem 10. Tag groß. Ein Abfall der Werte zum 40. Tag, dem 130. Tag nach Fütterungsbeginn wie im Falle der 60 Tage gefütterten Tiere, wird von einem Anstieg des MI zum 60. postoperativen Tag gefolgt. Am 70. Tag fällt der MI wieder leicht ab. Auch in dieser Gruppe verläuft die Kurve des MI des umliegenden Parenchyms annähernd parallel zu der der EDB - Markierung.

In beiden Gruppen zeigen sich nach dem 130. Tag nach Fütterungsbeginn in den EDB Subpopulationen erhöhter Proliferation, und das Zellbild wird im Ganzen unruhiger. Spätestens zu diesem Zeitpunkt liegt kein einheitliches Proliferationsgeschehen in den EDB vor. Die Proliferation im umliegenden Parenchym zeichnet sich durch eine erhöhte Basalaktivität aus.

Die 60 Tage mit Däna gefütterten und anschließend teilhepatektomierten Tiere überlebten nach Fütterungsbeginn im Mittel $293,4 \pm 81,8$ Tage. Nahezu alle Tiere hatten Lebertumoren. und z.T. Metastasen in Lunge und Großem Netz. Einige hatten kleine Nierentumoren. Aus Vergleichszahlen anderer Autoren geht hervor, daß die Teilhepatektomie zu dem späten Termin der Cancerogenese keinen Einfluß auf Tumorausbeute oder Überlebenszeit der Kontrolltiere hat.

Die 90 Tage gefütterten Tiere mit anschließender Teilhepatektomie überlebten nach Fütterungsbeginn $171,9 \pm 34,1$ Tage. Alle Tiere hatten hepatocelluläre Carcinome.

Metastasen wurden in der Lunge und dem großen Netz gefunden.

Auch zu diesem späten Zeitpunkt nach Fütterungsbeginn hat die Teilhepatektomie keinen Einfluß mehr auf Tumorausbeute oder Überlebenszeit, wie aus Vergleichszahlen mit Versuchen, bei denen nichthepatektomierte Tiere verwendet wurden, hervorgeht.

Nach den Ergebnissen kann angenommen werden, daß ein Proliferationsreiz in Form einer Teilhepatektomie zu einem späten Zeitpunkt der Däna - Cancerogenese keinen Einfluß auf das Wachstum von präneoplastisch veränderten Zellpopulationen in der Leber hat. Auch die Tumorentstehung dürfte dadurch nicht beeinflusst werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- ANDERSON, R.A., RAINA, P.M. and MILHOLLAND, R.J.: Altered responses to Cortisol in precancerous Liver. Oncologia, 20: 153-166 (1966).
- ANTHONY, P.P.: Precursor lesions for liver cancer in humans. Cancer Res. 36, 2579-2583, 1976
- ARMITAGE, P. and DOLL, R.A.: A two stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. Brit. J. Cancer 11, 161-169, 1957.
- ARMITAGE, P. and DOLL, R.: Stochastic models of carcinogenesis Proc. IV. Berkley Symposium Math.Stat.Probab. 4, 19, Univ. Cal. Press, Los Angeles (1961)
- BANNASCH, P.: Nitrosamin- induzierte Glykogenose und Geschwulstbildung in der Rattenleber. Verh. Dtsch. Ges. Path. 51, 343(1967).
- BANNASCH, P.: The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis, Springer, New York (1968).
- BANNASCH, P.: Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. Cancer Res. 36 2555-2562 (1976).
- BECKER, F.F. and KLEIN, K.M.: The effect of L-Asparaginase on mitotic activity during N-2-Fluorenylacetamide hepatocarcinogenesis: Subpopulations of nodular cells. Cancer Res. 31, 169 (1971)
- BECKER, F.F., FOX, R.A., KLEIN, K.M. and WOLMAN, S.R.: Chromosome patterns in rat hepatocytes during N-2-fluorenylacetamid carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 46 1261-1269 1971.

BOUTWELL, R.K.: Some aspects of skin carcinogenesis.

Progr. exp. Tumor Res. 4, 207 (1964)

BURNSSTEIN, N.A. and ALLISON, A.C.: Effect of antilymphocytic serum on the appearance of reticular neoplasms in SJL/J mice. Nature 225, 1139 (1970).

COTÉ, J.W., GENIEPI, W. and BOCHNER, F.: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während der experimentellen cancerisierung durch Diäthylnitrosamin. Beitr. Path. Anat. 127, 450 (1962)

CRADDOCK, V.M.: Livercarcinogenesis induced in rats by single administration of Dimethylnitrosamine after partial hepatectomy. J. Nat. Cancer Inst. 47, 889-907 (1971).

CRADDOCK, V.M.; Effect of a single treatment with the alkylating Carcinogens Dimethylnitrosamine, Diethylnitrosamine and Methyl Methansulphonate, on Regenerating after Partial Hepatectomy. I. Test for Induction of Liver Carcinomas. Chem. Biol. Interactions, 10(1975) 313-321.

CRADDOCK, V.M.: Effect of a single treatment with the alkylating carcinogens Dimethylnitrosamine, Diethylnitrosamine and Methyl Methansulfonate on liver regenerating after partial hepatectomy. II Alkylating of DNA and inhibition of DNA replication. Chem. Biol. Int. 10, 315, 323 (1975)

CRADDOCK, V.M.: and FREI, J.V.: Induction of liver cell adenomas in the rat by a single treatment with N-methyl-N-Nitrosourea, given at various times after partial hepatectomy. Brit. J. Cancer 30, 503 (1974).

DAWSON, K.M., Chem.-Biol. Interactions 5, 153 (1972)

- DRUCKREY, H.R., PREUSSMANN, D., SCHMÄHL und MILLER, M.:
Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei
Nitrosaminen. Naturwissenschaften 48, 134 (1961).
- EPSTEIN, S.M., ITO, N., MERKOW, L., and FARBER, E.: Cellular
analysis of liver carcinogenesis of large hyperplastic
nodules in the liver with 2-Fluorenylacetylarnide or
Ethionine and some aspects of their morphologie and
glycogenmetabolism. Cancer Res. 27, 1702 (1967).
- FABRIKANT, J.I.: The kinetics of cellular proliferation in
regenerating liver. J. Cell Biol. 36, 551 (1968).
- FARBER, E.: Similarities in the sequence of early
histological changes induced in the liver of the rat
by Ethionine, 2-Acetylaminofluorene and 3'-Methyl-
dimethylaminosazobenzene. Cancer Res. 16, 142 (1956).
- FARBER, E.: Pathogenesis of liver cancer Arch.Pathol 98
145-148, 1974
- FARBER, E.: Biochemical Pathologie of experimental liver
carcinogenesis. In: G.W. Warwick, H.M. Cameron and
C.A. Linsell (eds.). Livercell cancer 245-279
Amsterdam: Elsevier Pub. Corp. 1976.
- FARBER, E., HARTMAN, S.P., SOLT, D. and CAMERON, R.: Studies
on precancerous liver cell populations and their
identifikations. In: T. Sugimura (ed), Fundamentals in
prevention of cancer. Proceedings of the 6 th Princess
Takamatsu Symposion Tokyo, Tokyo Press University 1975
- FARBER, E., HARTMAN, S. and SOLT, D.: Interruption of
Differentiation (blocked ontogeny) during induction
of liver cancer with hepatocarcinogens. Proc. Am.
Assoc. cancer res., 16: 3 1975.

FARBER, E.: Ethionine carcinogenesis. Adv. Cancer Res. 7:383-474, (1963).

FARBER, E.: Studies on the molecular mechanisms of carcinogenesis. In Miami Winter Symposia, vol. 2 Amsterdam, North-Holland Publishing Co., pp 314-334 (1970)

FARBER, E.: Carcinogenesis-cellular evolution as a unifying thread: Presidential address. Cancer Res. 33, 2537 (1973).

FARBER, E., PARKER, S. and GRUENSTEIN, M.: The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens. Cancer Res. 36, 3879-3887 1976.

FARBER, E.: Hyperplastic liver nodules. Methods in cancer research. ed. H. Busch, Vol. VII. Academic Press New York and London (1973).

FIALA, S. and FIALA, A.E.: Intracellular localisation of carcinogen and its relationship to the mechanism of carcinogenesis in rat liver. Brit. J. Cancer 13, 236 (1959 b).

FREI, J.V. and RITCHIE, A.C.: Diurnal variations in the susceptibility of mouse epidermis to carcinogen and its relationship to DNA-Synthesis. J. Natn. Cancer Inst. 32, 1213 (1964).

FRIEDRICH-FREKSA, H. and HOFFMANN, M.: Immunological defence against preneoplastic stages of Diethylnitrosamine-induced carcinomas in rat liver. Nature 223, 1162 (1969).

FRIEDRICH-FREKSA, H., PAPADOPULU, G. und GÖSSNER, W.: Histochemische Untersuchungen in der Rattenleber nach zeitlich bergrenzter Verabfolgung von Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 72, 240 (1969).

- FRIEDRICH-FREKSA, H., GOSSNER und BÖRNER, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 72, 226 (1969).
- GERCHMANN, L.L. and LUDLUM, D.B.: Properties of O⁶- Methylguanine in templates for RNA-Polymerase. Biochem. Biophys. Acta 308, 310 (1973).
- A.D. GLINOS, N.L.R. BUCHER and J.C. AUB, J. exp. Medicine 93, 313 (1951).
- GÖSSNER, W. und FRIEDRICH-FREKSA, H.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber während der Cancerisierung durch Nitrosamine. Zschr. Naturforsch. 19 b, 862 (1964).
- GREENSTEIN, J.P.: Biochemistry of cancer, New York: Academic Press 1954
- GRISHAM, J.W.: Inhibitory effect of tritiated Thymidine on regeneration of the liver in the young rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 905, 555 (1960).
- GRISHAM, J.W.: A morphologic study of desoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver, Autoradiography with Thymidine-³H. Cancer Res. 22, 842 (1962)
- GRONDMANN, E. und SIEBURG, H.: Die Histogenese und Cyto-genese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. Beitr. Anatol. Anat. 126, 57 (1962).
- HADDOW, A.: Acta unio int. Contra Cancrum 3, 342 (1938)

- HARKNESS, R.D.: Regeneration of the liver.
Brit. Med. Bull. 13, 87 (1957).
- HIGGINS, G.M. and ANDERSON, F.M.: Experimental Pathology
of the liver of the white rat following partial surgical
removal. Arch. Path. 12, 186-202 (1931).
- HOFFMANN, M.: Critical time dependence of effect of liver
regeneration on carcinogenesis in the rat liver.
Zschr. Naturforsch. 25 b, 434 (1970).
- HOLLANDER, C.F. and BENTVELZEN, J. natn. Cancer Inst.,
41, 1303 (1968).
- KARASAKI, S.: Ultrastructural and cytochemical studies
on hyperbasophilic foci with special reference to the
demonstration of cell surface alterations in hepato-
genesis. Cancer Res. 36, 2567-2572 (1976).
- KITAGAWA, T.: Responsivness of hyperplastic lesions and
hepatomas to partial hepatectomy. Gann 62, 217 (1971).
- KITAGAWA, T. and PITOT, H.C.: The regulation of serine
dehydrogenase and Glucose-6-Phosphatase in rat liver
during Diethylnitrosamine and N-2-Fluorenylacetamide
feeding. A histochemical study. Cancer Res. 35 1075 (1975).
- KITAGAWA, T., and SUGANO, H.: Combined Enzyme histochemical
and radioautographic studies on areas of hyperplasia in the
liver of rats fed N-2-Fluorenylacetamide.
Cancer Res., 33: 2993-3001 (1973)
- KITAGAWA, T. and SUGANO, H.: Timetable for hepato-
carcinogenesis in rat. In: W. Nakahara, K. Hirayama, K.
Nishioka and H. Sugano (eds.). Analytic and experimental
epidemiology of cancer, proceedings of the 3rd
International Symposium on the Princess Takamatsu
Cancer Res. Fund. Tokyo: Univ. of Tokyo Press, 91-105 1973

- LALIKD, A.K. and BARTON, A.D.: Nature (London) 183, 1655 (1959).
- LALIKD, A.K., and BARTON, A.D. Cell Proliferation in pre -
cancerous Liver: Relation to Presence and Dose of Carcinogen.
J. Natl. Cancer Inst., 27: 827-839, 1961.
- LAW, L.W.: Effects of antilymphocyte serum on the induction
of neoplasm of lymphoreticular tissues.
Feen. Proc. 29, 171 (1970).
- LAWS, J.O., Tissue regeneration and tumor development.
Brit. J. Cancer 13, 669 (1959).
- LOVELESS, A.: Possible relevance of O⁶-Alkylation of
Desoxyguanosine to the mutagenicity of Nitrosamines and
Nitrosamides. Nature 223, 206 (1969).
- MAGEE, P.N. and BARNES, J.M.: The production of Malignant
primary hepatic tumors in the rat by feeding Dimethyl-
nitrosamine. Brit. J. Cancer 10, 114 (1956).
- MAGEE, P.N. and BARNES, J.M., The production of malignant
primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethyl-
nitrosamine, Brit.J.Cancer, 10 (1956) 114-122.
- MAINI, M.M. and STICH, H.F.: Chromosomes of tumor cells.
III. unresponsiveness of precancerous hepatic tissue
and hepatomas to a mitotic stimulus.
J. Nat. Cancer Inst. 28, 755 (1962).
- MENDELSON, M.L.: Autoradiographic analysis of cell
proliferation of spontaneous breast cancer of c 3H-
mouse. III. The growth fraction.
J. Nat. Cancer Inst. 28, 1015 (1962 a).
- MENDELSON, M.L.: Chronic infusion of tritiated Thymidine
into mice with tumors. Science 135, 213 (1962 b).

- MOHR, U., SPELTZEN, R. und KNECHT, M.: Die Regeneration der chronisch durch Diäthylnitrosamin geschädigten Leber nach Teilhepatektomie. Zschr. Naturforsch. 23, 528 (1968).
- MORRIS, N.R. and PITOT, H.C.: vergl. Pitot, H.C. (1966)
- MOTTRAM, J.C.: A diurnal variation in the production of tumours. J. Path. Bact., 57, 265 (1945).
- NEWEERNE, P.: Experimental hepatocellular Carcinogenesis. Cancer Res. 36, 2573-2578, (1976).
- NAKAHARA, W.: Critique of carcinogenic mechanism. Progr. exp. Tumor Res. 2, 158 (1961)
- NICOLL, J.W., SWANN, P.F., and PEGG, A.E., Effect of dimethylnitrosamine on persistence of methylated guanines in rat liver and kidney DNA. Nature, Vol. 254 no. 5497, 261-262 1975.
- OEHLERT, W. und BLOCK, P.: Der Mechanismus und zeitliche Ablauf der regenerativen Regeneration in Geweben mit post- und intermitotischem Zellbestand. Verh. Dtsch. Ges. Path. 46, 333-340 (1962).
- OKITA, K., GRUENSTEIN, M., KLAIBER, M., and FARBER, E.: Localisation of alpha-Fetoprotein by Immunfluorescence in Hyperplastic Nodules during Hepatocarcinogenesis induced by 2-Acetylaminofluorene. Cancer Res. 34 2758-2763, (1974).
- PACK, G.T., ISLAMI, A.H., HUBBARD, J.C., and BRASFIELD, R.D.: Regeneration of human liver after major hepatectomy. Surgery 52, 617, (1962).

PITOT, H.C.: some biochemical aspects of malignancy.
Ann. Rev. Biol. 35, 335 (1966).

POIRIER, L.A., POIRIER, M.C. and PITOT, H.C.: Dietary
Induction of some enzymes of Amino Acid Metabolism
during 2-Acetylaminofluorene feeding.
Cancer Res.: 29: 464-469, 1969.

POIRIER, L.A., POIRIER, M.C. and PITOT, H.C.: Dietary
Induction of some enzymes of Carbohydrate Metabolism
during 2-Acetylaminofluorene feeding.
Cancer Res. 29: 470-474, 1969.

RABES, H.M. und BRÄNDLE, H.: Synthesis of RNA, Protein,
and DNA in the liver of normal and hypophysectomized
rats after partial hepatectomy. Cancer Re. 29: 817 (1969).

RABES, H.M., HARTENSTEIN, R. und SCHOLZE, P.: Specific
stages of cellular response to homeostatic control
during Diethylnitrosamin- induced liver carcinogenesis.
Experientia 26, 1356 (1970 b).

RABES, H.M., HARTENSTEIN, R. und SCHOLZE, P.: Hemmung der
Proliferationsaktivität partiell resezierter Lebern durch
Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 73, 239 (1970 b).

RABES, H.M., SCHOLZE, P. und HARTENSTEIN, R.: Spezifische
Stadien im Wachstumsverhalten präneoplastischer Zellen
während der Cancerogenese. Verh. Dtsch. Ges. Path. 54,
428-433 (1970 c).

RABES, H.M., SCHOLZE, P. und JANITSCH, B.: Growth kinetics
of Diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient pre-
neoplastic liver cell populations in vivo und in vitro.
Cancer Res. 32, 2577 (1972).

- RABES, H.M., und TUCZEK, H.V.: Quantitative autoradiographische Untersuchungen zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Virch. Arch. Abt. B Zellpath. 6, 302 (1970).
- RABES, H.M. und ZETTLER, C.: Relation between preneoplastic lesions, cell proliferation and development of carcinoma in the liver after discontinuous application of Diethylnitrosamine. XI. Intern. Cancer Congress Florenz (1974).
- RAJEWSKY, M.F., DAUBER, W. and FRANKENBERG, H.: Liver-carcinogenesis by Diethylnitrosamine in the rat. Science 152, 83 (1966).
- RAJEWSKY, M.F.: Changes in DNA-Synthesis and cell proliferation during hepatocarcinogenesis by Diethylnitrosamine. Europ. J. Cancer 3, 355 (1967).
- RAJEWSKY, M.F., Proliferative parameters of mammalian cell systems and their role in tumour growth and carcinogenesis, Z. Krebsforsch., 78 (1972) 12-30.
- RAPPAPORT, A.M.: Acinar units and the pathophysiology of the liver, In: The liver, p 625 Academic Press London (1963).
- REUBER, M.D.: Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0,025 % N₂-Fluorenyl-diacetamid. J. Nat. Cancer Inst. 34, 697 (1965).
- REUBER, M.D. and FIRMINGER, H.I.: Morphology and biologic correlation of lesions obtained in hepatic carcinogenesis in AxC rats given 0,025 % N-2- Fluorenyl-diacetamid. J. Nat. Cancer Inst. 31, 1407 (1963).
- ROBLIN, E., MASUKO, K., GOLDFARB, S., and ZAK, F.G. Role of Cell Proliferation in Hepatic Cancerogenesis. Proc Soc. Exptl. Biol. Med., 115: 381-384, 1964.

- SCHAUER, A.: Histochemische und biochemische Untersuchungen bei der Cancerisierung mit Diäthylnitrosamin an der Rattenleber. Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 344 (1966).
- SCHAUER, A. und KUNZE, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 70, 252 (1968).
- SCHERER, E. und EMMELLOT, P.: Foci of altered liver cells induced by a single dose of Diethylnitrosamine and partial hepatectomy: Their contribution to hepatocarcinogenesis in the rat. Europ. J. Cancer 11, 145 (1975).
- SCHERER, E. and EMMELLOT, P.: Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci, and tumour formation by diethylnitrosamine in the rat. Europ. cancer 11, 689 (1975).
- SCHERER, E. und HOFFMANN, M.: Probable clonal genesis of cellular islands induced in rat liver by Diethylnitrosamine. Europ. J. Cancer 7, 369 (1971).
- SCHERER, E., VAN DIJK, W.F.M., and EMMELLOT, P.: The effect of antilymphocytic and normal horse serum on growth of precancerous foci and development of tumours induced by diethylnitrosamine in rat liver. Europ. J. Cancer 12 25-31 1976.
- SCHERER, E., HOFFMANN, M., EMMELLOT, P. and FRIEDRICH-FREKSA, M.: Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of Diethylnitrosamine and partial hepatectomy. J. Nat. Cancer Inst. 49, 93 (1972).

- SCHEKER, E. and EMMELLOT, P.: Kinetics of induction and growth of enzym-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 36, 2544-2554 (1976).
- SCHIEFERSTEIN, G., PIRSCHEL, J., FRANK, W. und FRIEDRICH-FREKSA, H.: Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust zweier Enzymaktivitäten in der Rattenleber nach Verfütterung von Diäthylnitrosamin. *Zschr. Krebsforsch.* 82, 191 (1974).
- SCHWÄHL, D., PREUSSMANN, R. und HAMPERL, H.: Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. *Naturwissenschaft.* 47, 89 (1960).
- SCHOLZE, P.: Proliferation und histochemische Enzymaktivität normaler und präneoplastischer Zellpopulationen in der Leber während der Diäthylnitrosamin-induzierten Carcinogenese. *Diss. München* (1972).
- SKORYNA, S.C. and WEBSTER, D.R.: Production of cirrhosis and liver tumors in male rats using high dosages of 2-Acetylaminofluorene. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 78: 62-67 1961.
- STÖCKER, E. und PFEIFER, U.: Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thymidin an der regenerierenden Rattenleber. *Zschr. Zellforsch.* 79, 374 (1967).
- STOCKER, E., TEUBNER, E., und ROSENBUSCH, S.: Die DNS-Synthese als Funktion des Alters in Leber und Niere der Ratte. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 48, 295-299 (1964).
- STICH, H.F.: *J.Nat. Cancer Inst.* 24, 1283 (1960)
- TELBOR, G.W., and BECKER, F.F. Regression and Persistence of Hyperplastic Hepatic Nodules Induced by N-2-Fluorenylacetamid and Their Relationship to Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 31: 1-3, 1971.

- THOMAS, C.: Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Lberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. Z. Krebsforsch. 64, 224 (1961).
- VASILIEV, J.M. and GUELSTEIN, V.E.: Sensitivity of normal and neoplastic cells to the damaging action of carcinogenic substances. J. Nat. Cancer Inst. 31, 1123 (1963).
- WACHSTEIN, M.: Enzymatic histochemistry of the liver. Gastroenterology 37, 525 (1959).
- WACHSTEIN, M. and MEISEL, E.: The histochemical Distribution of 5-Nucleotidase and unspecific alkaline-phosphatase in the testicle of various species and in two human seminoms. J. Histochem. Cytochem. 2, 137 (1954).
- WACHSTEIN, M. and MEISEL, E.: On the histochemical distribution of Glucose-6-Phosphatase. J. Histochem. 4, 592 (1956).
- WEBBER, M.M. and STICH, H.F.: Can. J. Biochem. 43 811 (1965)
- WEBER, G. and CANTERO, H.: Glucose - 6 - Phosphatase activity in normal, precancerous and neoplastic tissues. Cancer Res. 15, 105 (1955)
- WEINBRENN, K.: Regeneration of the liver. Gastroenterology 37 657 (1959).

Lebenslauf

Ich, Wolf-Dieter Flakowski, wurde am 25. Juli 1943 als Sohn des Kaufmannes Alfred Flakowski und dessen Ehefrau Else, geb. Rogalla, in Königsberg/Pr. geboren. Von 1950 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Scheeßel, Kreis Rotenburg/Hann. Anschließend besuchte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Scheeßel. Im Januar 1958 siedelte ich nach Fürstenfeldbruck/Obb. über und besuchte hier wiederum das Gymnasium. 1964 verließ ich das Gymnasium, um die Lehre als Werbekaufmann zu beginnen. 1968 trat ich in das Münchenkolleg in München ein, und machte dort 1970 das Abitur. Im Sommersemester 1971 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach 4 vor-klinischen Semestern legte ich dort die ärztliche Vorprüfung ab. Nach weiteren 6 Semestern bestand ich im Sommer 1976 das medizinische Staatsexamen. Im Oktober 1976 begann ich als Medizinal-assistent auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Eichstätt. Vom Juni 1977 bis Oktober 1977 arbeitete ich in der Krankenanstalt Dr. May in Kreuth/Obb. auf der Internen Abteilung. Seit Februar 1978 arbeite ich auf der Internen Abteilung des Kreiskrankenhauses Mindelheim.

